Aus dem
Botanischen Institut
Universität Düsseldorf

Zusammenhänge zwischen der genetischen Information des Plastoms und der Biochemie der Photosynthese

Habilitationsschrift
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
zur Erlangung der
venia legendi
für
Pflanzenphysiologie

vorgelegt
von
Ulrich W. Hallier
aus
Offenbach / Main
im Mai 1980

UNIV.
LEIDEN
BIB.

I N H A L T

Einleitung			1 - 3
Material:	Entstehung und Propagierung der Mutanten		3 - 6
	Cytologie		6 - 7
Methoden			8 - 11
Ergebnisse: 1.	Pigmentbestimmungen		12 - 16
A.)	Untersuchungen des Calvin-Zyklus		16 - 37
	2a. Warburg-Manometrie	16 - 17	
	2b. CO_2-Gaswechsel-Messungen	17 - 20	
	3. Assimilation von $^{14}CO_2$	20 - 30	
	Autoradiographie-Beispiele	22 - 23	
	^{14}C-Daten der Tabelle 3	23 - 30	
	4. Die photosynthese-spezifischen Enzyme	30 - 37	
	NADP-abhängige GAPDH	32 - 35	
	Phosphoribulokinase	32 - 35	
	RuBP-Carboxylase	35 - 37	
B.)	Untersuchungen des Elektronentransportes		37 - 66
	5. PGS- und ATP-Pegel-Messungen	38 - 41	
	6. NADPH-Pegel-Messungen	42 - 43	
	7. Photoreduktion von DCPIP + MV	43 - 44	
	8. Differenz-Spektren	44 - 53	
	a) Membranpotential-Signal	47 - 50	
	b) Cytochrom f	50 - 51	
	c) Cytochrom b	52 - 53	
	9. Fluoreszenz	53 - 59	
	10. Lichtstreuung	60 - 66	
C.)	Defekt-Lokalisationen bei verschiedenen Mutanten-Typen		66 - 81
	a) Photosystem II-Mutanten: $I\alpha$, $I\gamma$, $I\delta$, $II\gamma$	66 - 69	
	b) Photosystem I-Mutante: $II\alpha$	70 - 71	
	c) Cytochrom f-Mutanten: $I\beta$, $II\eta$	71 - 76	
	d) RuBP-Carboxylase-Mutanten: $I\sigma$, $IV\beta$, $V\alpha$	76 - 81	
D.)	Defekt-Analysen des restlichen Mutanten-Sortimentes		81 - 87
Diskussion			88 - 97
Literatur			98 - 115

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0039

nleitung: "Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution" überschrieb RENNER (1934) den Bericht, in welchem er seine Untersuchungen über die Existenz plasmatischer, extrachromosomaler Erbanlagen veröffentlichte. Die Summe aller in den Plastiden lokalisierten Erbanlagen nannte er zur Unterscheidung vom nukleären Genom das "Plastom".

Die Arbeiten Renners, welche wesentlich zur Verbreitung der Erkenntnis beitrugen, daß Plastiden Träger genetischer Information der Zelle sind, bauen auf den Arbeiten von CORRENS (1909a, b) und BAUR (1909) auf. In deren inzwischen sieben Jahrzehnte zurückliegenden Versuchen ging es erstmals um die Rolle, welche das Plasma neben dem Zellkern bei der Vererbung spielt; schon die damaligen Ergebnisse widersprachen der herrschenden Lehre vom Monopol der Chromosomen, d.h. des Kernes bei der Vererbung. Als wesentlich sind in diesem Zusammenhang auch die Arbeiten von DE VRIES (1909/10) und LEHMANN (1922) zu nennen.

Wir dürfen heute davon ausgehen, daß die Plastiden Autoreduplikanten sind; d.h., daß ihre morphologische Kontinuität dadurch gewährleistet ist, daß sie sich nicht de novo bilden, sondern nur durch Teilung vermehren.

Dieses Ergebnis brachten bereits die frühen Arbeiten von SCHMITZ (1882), SCHIMPER (1883, 1885) und MEYER (1883) über die Plastiden-Entwicklung. Neuere elektronenoptische Untersuchungen haben diese Befunde bestätigt (vgl. hierzu STUBBE 1966, 1971). Diese Vermehrungsweise bedeutet jedoch auch, daß die genetische Information der Plastiden autoredupliziert und auf die neu gebildeten Plastiden verteilt werden muß.

Den Beweis, daß diese Zellorganellen über DNS und eine eigene DNS-gesteuerte Proteinsynthese verfügen, daß Zusammenhänge zwischen der Chloroplasten-DNS und der Chloroplasten-Entwicklung wie auch der Bildung von Ribosomen in den Chloroplasten bestehen, lieferten u.a. die

Arbeiten von GIBOR und IZAWA (1963), WOLLGIEHN und MOTHES (1963, 1964), GIBOR und GRANICK (1964), SCHIFF und EPSTEIN (1966), GRANICK und GIBOR (1967), KIRK und TILNEY-BASSETT (1967), SCOTT und SMILLIE (1967), SCHÖTZ (1967), HAGEMANN (1968), KIRK (1972), HERRMANN et al. (1976).

Daß Plastiden Erbträger sind, läßt sich schließlich auch durch den Nachweis spezifischer Plastomdifferenzen begründen. Dieser Nachweis wurde geführt über phänotypische Plastiden-Unterschiede, welche einen an die Plastiden selbst gebundenen Erbgang zeigen und somit auf Erbanlagen in den Plastiden zurückgehen müssen (STUBBE 1964, 1966, 1971).

Dieser prinzipielle Zusammenhang zwischen mutierter genetischer Information der Chloroplasten und dem Erbgang der Chloroplasten selbst wurde auch von Michaelis untersucht (MICHAELIS 1955). Er benutzte hierfür als Hauptkriterien die quantitativen Unterschiede bei der Aufspaltung von Hybriden aus reziproken Kreuzungen zwischen normalen und mutierten Pflanzen.

Der indirekte Beweis genetischer Kontinuität läßt sich bei Chloroplasten über sogenannte "Mischzellen" führen - Zellen, welche zwei verschiedene Chloroplasten-Typen enthalten und beide Typen über viele Zell-Generationen hinweg beibehalten, was auf genetische Unterschiede zwischen ihnen rückschließen läßt (vgl. hierzu HAGEMANN 1964, STUBBE 1971).

Die Spezifität dieser genetischen Information der Plastiden bzw. die Durchbrechung ihrer Konstanz durch zufällige Veränderungen in Gestalt spontaner Mutationen bietet eine Handhabe zur Untersuchung der genetischen Aktivität des Plastoms.

Defekt - Lokalisationen von Plastom-Mutanten bieten eine Möglichkeit, direkte Zusammenhänge zwischen der genetischen Information des Plastoms und den vom Plastom gesteuerten zellulären Prozessen aufzudecken: Ziel der an Oenothera-Plastom-Mutanten durchgeführten Untersuchungen war eine Analyse der Defektstellen im zellphysiologischen

Geschehen - genauer: in der Biochemie der Photosynthese -, welche auf die Mutation des Plastoms zurückzuführen sind.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Antwort auf die bisher noch offene Frage, worauf sich die genetische Selbständigkeit der Plastiden erstreckt und wie weit sie reicht, d.h. welche zellulären Prozesse von den in den Plastiden lokalisierten Erbanlagen gesteuert werden.

aterial: Das Pflanzenmaterial für die hier zu besprechenden Untersuchungen entstammt einem umfangreichen Sortiment von Oenothera-Plastom-Mutanten.

Diese Mutanten traten im Laufe der letzten Jahre spontan auf - mit einer Rate von 0,3% der Pflanzen (STUBBE 1953, KUTZELNIGG 1968, KUTZELNIGG und STUBBE 1974) - und wurden nach und nach isoliert.

Phänotypisch lassen sich die Mutationen am unterschiedlichen Ergrünungsgrad des Blattgewebes erkennen; auf Grund dieses Merkmals wurden die Mutanten selektiert. Dementsprechend ist allen so isolierten und genetisch gut bekannten Mutantentypen dieses Sortimentes gemeinsam, daß bei ihnen eine Plastom-abhängige Chlorophyll-Defizienz (in Verbindung mit allen bekannten Genotypen) auftritt. Genetische Analysen haben gezeigt, daß mit Sicherheit Erbänderungen des Plastoms vorliegen und daß es sich nicht um Folgeerscheinungen von Disharmonien zwischen den verschiedenen Genomen und Plastomen handelt.

Infolge der Unterschiedlichkeit der Chlorophyll-Defizienzen variiert der Ergrünungsgrad der verschiedenen Mutanten von fast weiß bis nahezu normal grün.

Diese Defekt-Mutationen führen dazu, daß die Mutanten meist letal sind, da sie sich nicht autotroph ernähren können, d.h. sie erreichen normalerweise nur das Keimblatt-Stadium. Bei allen diesen Plastom-Mutanten kann jedoch die Letalwirkung der Plastom-Veränderung dadurch kompensiert werden, daß das chlorophylldefiziente Gewebe von normal grünem miternährt wird (KUTZELNIGG und STUBBE 1974).

Neben der normalerweise benutzten Möglichkeit einer Pfropfung von letalen Keimlingen auf normal grüne Pflanzen oder auch ihrer Erhaltung durch heterotrophe Ernährung in Gewebekultur bietet sich bei Oenothera vor allem die Möglichkeit der Kreuzung von Blüten "unmutierter", "normaler" Zweige (mit Chloroplasten, deren genetische Information nicht mutiert ist) mit Blüten "mutierter" Zweige (welche Chloroplasten enthalten, deren Erbanlagen mutiert sind). Auf diese Weise lassen sich immer wieder variegate Pflanzen erzeugen, da auch der Pollen Plastiden auf die Nachkommen überträgt ("biparentale Plasma- und Plastidenübertragung").

Bei den so erzeugten Kreuzungen von "normalen" mit "mutierten" Pflanzen ergeben sich häufig Nachkommen, die sich im Verlauf der somatischen Plastiden-Segregation als Sektorial-Chimären entwickeln. Diese sektoral unterschiedlichen Chimären bieten im Gegensatz zu den ebenfalls vorkommenden Mosaik-Panaschüren und Periklinal-Chimären Blatt- und Pflanzenpartien, deren Gewebe ausschließlich die mutierten Plastiden enthält, welche durch die Kreuzung eingeführt wurden. (Mosaik-Panaschüren und Periklinal-Chimären kommen für biochemische Untersuchungen nicht in Betracht, da bei ihnen die Gewebspartien mit mutierten Chloroplasten nicht von denjenigen mit unmutierten Chloroplasten zu trennen sind.)

Daß es sich hierbei tatsächlich um eine echte Plastiden-Entmischung handelt, zeigen die charakteristische Entwicklung des Scheckungsmusters und die relativ schnelle Entmischung, die entsprechend einer Faustregel von Michaelis nach n x 10 Zellteilungsfolgen (n = Anzahl Plastiden/Zelle) beendet ist (STUBBE 1966).

Solch "mutiertes" Gewebe entwickelt sich meist - je nachdem, wie gut es von Pflanzen- oder Blatteilen mit unmutierten Chloroplasten miternährt wird - normal, unterscheidet sich jedoch stets deutlich durch seine hellere Farbe von den jeweiligen normalen Blättern bzw. unmutierten Sektoren. Der Grad des Ausbleichens variiert, wie be-

reits erwähnt, von Mutante zu Mutante sehr stark und ist auch unterschiedlich je nach Kombination mit den verschiedenen Genotypen, da oft zusätzlich eine graduell verschiedene Genom-Plastom-Inkompatibilität hinzu kommt.

Außerdem ist der Grad der Bleichheit sehr von den Kulturbedingungen abhängig (Schwachlicht begünstigt die Chlorophyllausbildung, da die Gefahr der Photo-Oxidation vermindert ist) und verändert sich außerdem während der Entwicklung in Abhängigkeit von Faktoren wie Alter und Wachstumsgeschwindigkeit der Blätter (vgl. KUTZELNIGG et al. 1975b).

Dennoch existiert bei jeder Mutante des hier bearbeiteten Sortimentes in jedem Entwicklungsstadium - auch bei den noch stark ergrünungsfähigen - ein Farbunterschied zu vergleichbarem, stets dunkler grünem Gewebe.

Ein wichtiger Punkt, der bei der Beurteilung des Plastoms und seiner Steuerfunktion nicht außer acht gelassen werden darf (HAGEMANN 1971), ist die Tatsache, daß das Plastom ja nur einen Teil des gesamten genetischen Systems der Zelle darstellt.

Dies bedingt, daß das Plastom (möglichst) mit allen Komponenten dieses gesamten, komplexen Systems harmonieren, d.h. an dieses System angepasst sein muß. STUBBE hat bereits 1959 das Spektrum der plastomabhängigen Merkmale untersucht, indem er auf dem Kreuzungswege Genom-Plastom-Kombinationen zwischen den bekannten drei Genotypen und fünf Plastomen der Untergattung Euoenothera herstellte (STUBBE 1959, 1960).

An deren phänotypischen Produkten konnten die Differenzen der natürlichen Plastome untersucht werden, wie sie in den verschiedenen Wildarten vorkommen. Auch die Auswirkungen extrem disharmonischer Genom-Plastom-Kombinationen wurden von STUBBE (1963) untersucht und haben weitere Hinweise auf das Zusammenwirken von Genom und Plastom erbracht (vgl. hierzu auch KUTZELNIGG und STUBBE 1974).

Bei diesen Untersuchungen der Genom-Plastom-Zusammenhänge bzw. des -Zusammenspiels kann das Plastom nur jeweils als

ein Komplex, d.h. als eine Einheit betrachtet werden.

Die bereits eingangs charakterisierten Plastom-Mutanten sollten es demgegenüber unter günstigen Umständen erlauben, daß der die Biochemie der Photosynthese betreffende Bereich des Plastoms in einzelne Erbfaktoren weiter aufzugliedern ist. Dies würde bedeuten, daß die Defekt-Analyse der Mutanten eventuell eine Möglichkeit bietet, zwischen verschiedenen funktionellen Untereinheiten des Plastoms zu differenzieren, welche unabhängig voneinander mutieren können (vgl. auch STUBBE 1959).

ytologie: Der cytologische Hintergrund für die Ausbleichung mutierten Gewebes wurde an einigen der hier zu besprechenden Oenothera-Plastom-Mutanten bereits früher elektronenmikroskopisch untersucht (STUBBE und v. WETTSTEIN 1955, DOLZMANN 1968, KUTZELNIGG et al. 1975a): die anfangs normale Struktur der Chloroplasten zeigt mit zunehmendem Alter eine je nach Mutantenart unterschiedlich starke Desorganisation des Feinbaues. Dieser Befund bezieht sich sowohl auf die Erhaltung des Membransystems der Thylakoide wie auch auf die Granastrukturen.Solche unterschiedliche Stadien des Abbaues der Feinstrukturen finden sich auch bei den Plastiden innerhalb einer Zelle. KUTZELLNIGG, MEYER und SCHÖTZ (1975a u. b) haben die nach Plastom-Mutation auftretenden Veränderungen an der Plastiden-Feinstruktur sowohl in ihrer Altersabhängigkeit als auch in bezug auf die jeweiligen Plastidentypen elektronenmikroskopisch untersucht. Diese Typen reichen bei dem untersuchten Sortiment von 28 Mutanten von praktisch thylakoidfreien bis zu beinahe normalen, granahaltigen Plastidenformen.

Die hier bearbeiteten Plastom-Mutanten - die aus allen bekannten Wildtyp-Plastomen der Euoenotheren stammen - sind sämtlich chlorophylldefekt und fast stets Letalmutanten.

Sie unterscheiden sich deutlich durch ihren von Mutante zu Mutante stark variierenden Chlorophyll-Anteil, der dem jeweiligen Grad entspricht, in dem die Feinstruktur der Chloroplasten verändert ist. Hinzu kommt i.a. mit zunehmendem

Alter die Wirkung von wahrscheinlich durch die Strukturstörungen bedingten Photooxidationsvorgängen (SCHÖTZ 1955, KANDLER und SCHÖTZ 1956), welche somit wiederum Rückschlüsse auf den Grad der jeweiligen Zerstörung der Lamellarstrukturen in den Chloroplasten zuläßt.
Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von KUTZELNIGG, MEYER und SCHÖTZ (1975b) zur Charakterisierung dieser Mutanten entsprechend ihrer Chloroplasten-Struktur bzw. der altersabhängigen Veränderung des Lamellarsystems kann man folgende Gruppierung der Plastom-Mutanten vornehmen:

1. Starke Veränderung des Lamellarsystems; schon junge Chloroplasten zeigen deutliche Aufblähungen der Thylakoid-Vesikel.
2. Vakuolisierung der Thylakoide erst im Laufe der Entwicklung, d.h. bei älteren Blättern; z.T. fehlen Granastapel, teilweise sind die Thylakoide zusammengequetscht, d.h. die Weite des Thylakoid-Innenraumes ist deutlich vermindert.
3. Weiterentwicklung der in jungem Stadium nur schwach ausgebildeten Chloroplasten-Feinstruktur ist stark verzögert, d.h. erst die Plastiden in ausgewachsenen Blättern gleichen sich allmählich der Normalform an.

Eine Korrelierung dieser elektronenoptischen Befunde mit den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen soll versucht werden.

Methoden: Für die vergleichenden Untersuchungen (mutiertes gegen unmutiertes, normales Gewebe) wurden meist - da häufig die Mittelrippe die beiden verschiedenen Gewebstypen voneinander trennt - die beiden verschiedenen Hälften eines Blattes genommen. Es ergaben sich jedoch die gleichen Resultate bei Verwendung von Mutanten-bzw. Wildtyp-Gewebe von verschiedenen Teilen einer Pflanze oder auch verschiedenen Pflanzen.

1. Pigmentbestimmungen: Das Gesamtchlorophyll wurde nach ARNON (1949), die Carotinoide und das (Chlorophyll a : Chlorophyll b)-Verhältnis wurden nach HOLM (1954) bestimmt.

2a. Warburg-Manometrie: Die O_2-Bilanz frisch entnommenen Gewebes im Licht-Dunkel-Wechsel wurde mit einem Warburg-Gerät VL (Braun/Melsungen) gemessen. (Vgl. HALLIER et al. 1968)

2b. CO_2-Gaswechsel-Messungen: Die CO_2-Bilanz von Blättern in situ wurde zunächst mit einem Infrarot-Gasanalysator von Beckman Instruments, Typ 215 A, später mit einem Gerät Typ UN5N.1/CO_2/0,005 von Maihak/Hamburg gemessen. Durchfluß von 8,2 l Luft mit 300 ppm CO_2 pro Stunde, Belichtung mit 540 Watt Weißlicht/m^2. (vgl. HALLIER und HEBER 1977).

Abkürzungen:

DCMU	- 3(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DCPIP	- 2,6-Dichlorphenolindophenol
DPC	- Diphenylcarbazid; 1,5-Diphenyl-carbohydrazid
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
FG	- Frischgewicht
GAPDH	- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13)
G-6-PDH	- Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49)
HEPES	- N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-Äthansulfonsäure
LDH	- Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
MV	- Methylviologen; N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid
PEP	- Phosphoenolpyruvat
PGK	- Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3)
PGS	- Phosphoglycerat
PK	- Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40)
PMS	- Phenazinmethosulfat
PVP	- Polyvinylpyrrolidon
Ri-5-P	- Ribose-5-phosphat
RuBP	- Ribulosebisphosphat = Ribulose-1,5-bisphosphat
SDS	- Natrium-Dodecylsulfat
TG	- Trockengewicht
ZDP / ZMP	- Zuckerbis- bzw. -monophosphate

3. Photosynthese: Das CO_2-Assimilationsvermögen frischen Gewebes wurde in sättigendem Weißlicht in Gegenwart von $^{14}CO_2$ gemessen. Die Blätter wurden nach 10 min. Belichtung in flüssigem N_2 abgetötet, gefriergetrocknet und extrahiert (vgl. HALLIER et al. 1968, HALLIER und HEBER 1977). Zum angewandten Chromatographie-Verfahren vgl. PEDERSEN et al. (1966), HALLIER et al. (1968). Autoradiographie auf Curix RP 1-Röntgenfilm (Agfa-Gevaert), Aktivitätsmessung mit F & H 407A-Zählrohr mit Goldfolie (Frieseke & Höpfner).
4. Enzymaktivitäten: Untersuchungen von Enzymen wurden in der Regel an gefriergetrocknetem Blattgewebe durchgeführt. Bei Oenothera erschwert bzw. verhindert der hohe Gerbstoffgehalt normalerweise die Messung von Enzymaktivitäten. Tannin-bedingte Enzymhemmungen treten zwangsläufig bei wässriger Extraktion von Zellaufschlüssen auf. Polyvinylpyrrolidon (Serva/Heidelberg bzw. Matheson, Coleman und Bell/Norwood, Cinc.) mit dem ungefähren Molekulargewicht von 40000 Daltons erwies sich als geeigneter Schutzstoff gegen die Hemmung von Enzymreaktionen durch Gerbstoffe. Darüber hinaus bewirkt die Zugabe von PVP zu Tannin-gehemmten Proben eine Reaktivierung der Enzymreaktionen (SCHNEIDER und HALLIER 1970).

NADPH-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13) wurde nach HEBER et al. (1963) zusammen mit der Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3) als Reduktion von PGS über die Oxidation von NADPH optisch gemessen (vgl. auch HALLIER et al. 1968).

Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19) wurde nach HALLIER et al. (1968) zusammen mit Ribose-5-phosphat-Isomerase (EC 5.3.1.6) über die Ribose-5-phosphat-abhängige ADP-Bildung gemessen, die sich mit Hilfe des Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase-Systems optisch verfolgen läßt (vgl. HALLIER et al. 1968).
Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (=Carboxydismutase) (EC 4.1.1.39) wurde sowohl im Testsystem nach PON (1960) über $^{14}CO_2$-Fixierung als auch im enzymatischen Test nach LILLEY und WALKER (1974) zusammen mit der Phosphoribulokinase gemessen. Ausgehend von Ribose-5-phosphat wird in diesem

Test die mit der CO_2-Fixierung zusammenhängende PGS-Umwandlung über das durch die NAD-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.29) oxidierte NADH photometrisch verfolgt.

5. Messung des Phosphoglycerat- und des ATP-Gehaltes von (nach Belichtung bzw. Verdunklung) in tiefgekühltem Petroläther abgetöteten Blättern erfolgte nach URBACH et al. (1965), SANTARIUS und HEBER (1965) photometrisch über die Oxidation von NADH bei der PGS-Umwandlung. Vgl. auch HALLIER (1968).

6. NADPH-Pegel-Messung wurde nach HEBER und SANTARIUS (1965) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Pools an reduzierten Pyridinnucleotiden mit Hilfe endogener Standards und enzymatischer Pyridinnucleotid-Reduktion über die Rate der Reduktion von DCPIP optisch gemessen. Vgl. auch HALLIER (1968).

7. Wässrige Chloroplasten-Isolierung erfolgte nach HALLIER (1968).

8. Photoreduktion von 2,6-Dichlorophenolindophenol und Methylviologen wurde im Ansatz nach HALLIER und HEBER (1977) photometrisch bzw. in einer O_2-Elektrode (Clark) gemessen.

9. Lichtabhängige Absorptionsänderungen intakter Blätter zur Erstellung von Licht-Dunkel-Differenz-Spektren wurden gemessen
a) mit Hilfe eines hochempfindlichen Einstrahl-Photometers (vgl. de KOUCHKOVSKY und FORK 1964, FORK und HEBER 1968),
b) mit einem Aminco-Zweistrahl-Spektralphotometer DW-2- UV/VIS, wie bereits beschrieben (HALLIER und HEBER 1977).

10. Chlorophyll-Fluoreszenz wurde gemessen, wie bei HALLIER und HEBER (1977) beschrieben.

11. Lichtstreuungsmessungen bei 538 nm an intakten Blättern wurden durchgeführt, wie bei HEBER (1969), HALLIER und HEBER (1977) beschrieben.

12. Redox-Differenz-Spektren zur Cytochrom-Untersuchung: Aufnahme der Spektren mit einem Shimadzu-Spektralphotometer Modell MPS 5000, Isolierung des Versuchsmaterials nach HEBER und SANTARIUS (1964), Herstellung des für die Aufnahme

der Spektren notwendigen Acetonpuders (Umwandlung des die Cytochrom f-Messung störenden Cytochroms b_{559HP} in die autoxidable Form des Cytochroms b_{559LP}) wie bereits beschrieben (HALLIER und HEBER 1977).

Eine Reihe ergänzender Untersuchungen wurde von Kollegen durchgeführt. Hierbei wurden folgende Methoden angewandt:
Immuno-Elektrophorese nach WADSWORTH und HANSON (1960), HALLIER und HEBER (1977), s.a. BERZBORN (unveröff.).
Gel-Elektrophorese nach BLAIR und ELLIS (1973), Herstellung der Gradienten-Gele nach MARGOLIS und KENRICK (1968), Gel-Färbung nach REISNER et al. (1975), SDS-Gel-Elektrophorese nach LAEMMLI (1970). Methodik insgesamt vgl. HALLIER et al. (1978).
Serologische Untersuchungen, Immunodiffusion nach KHRAMKOVA et al. (1963), Methodik s. HALLIER et al. (1978), VOLODARSKY et al. (1979).

Nachdrücklich gedankt sei an dieser Stelle Prof. Dr. R. Berzborn, Abtlg. Biochem. der Pflanzen, Ruhr Univ. Bochum (Immuno-Elektrophorese), Dr. J. Schmitt, Bot. Inst. Univ. Würzburg (Gel-Elektrophorese), Dr. S. Chaianova und Dr. A Volodarsky, Inst. f. Pflanzenphysiol. USSR Akad. d. Wiss., Moskau (Immunodiffusion) für ihre ergänzenden Untersuchungen.

Ergebnisse: 1. Pigmentbestimmungen

Zur Klärung der Frage, ob die beobachtete Pigmentdefizienz (mit)verantwortlich für die fehlende Vitalität der Mutanten sein könnte, wurde zunächst das Pigmentmuster der mutierten Chloroplasten aller 28 Plastom-Mutanten untersucht.

Zur Ausscheidung jahreszeitlich bedingter Schwankungen wurden die Pigmentbestimmungen über das ganze Jahr hin an Material unterschiedlichen Alters, vorwiegend jedoch an jüngeren Blättern vorgenommen. Erfahrungsgemäß darf man bei frühen Entwicklungsstadien der Mutanten-Blätter (bei ca. 2 cm Länge) am ehesten relativ günstige Verhältnisse erwarten. Bei solch jungen Blättern spielt meist ein eventueller Abbau bzw. eine mögliche photooxidative Zerstörung der Plastiden-Feinstruktur noch eine relativ geringe Rolle.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse zahlreicher Pigmentbestimmungen: Chlorophyll, Carotinoidgehalt und Verhältnis des Chlorophylls a : Chlorophyll b bei Blättern mit normalen bzw. mit mutierten Chloroplasten.

Zur näheren Charakterisierung der sehr unterschiedlich pigmentierten Mutanten wurden die Ergebnisse sowohl auf das Trockengewicht bezogen wie auch auf die = 100 gesetzte Pigmentierung der Normalen, d.h. der Blätter mit unmutierten Chloroplasten.

Von dem untersuchten Sortiment von 28 Mutanten liegen nur 10 im oder unterhalb des kritischen Bereiches von ca. 15% des Chlorophyllgehaltes unmutierter Pflanzen, der als normalerweise für den Ablauf der Photosynthese ausreichend gehalten wird (SCHÖTZ 1955, KANDLER und SCHÖTZ 1956, SCHÖTZ et al. 1966).

Tabelle 1: Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt sowie das Chlorophyll (a:b)-Verhältnis der Mutanten in bezug auf das Trockengewicht bzw. in Relation zur Normalform.

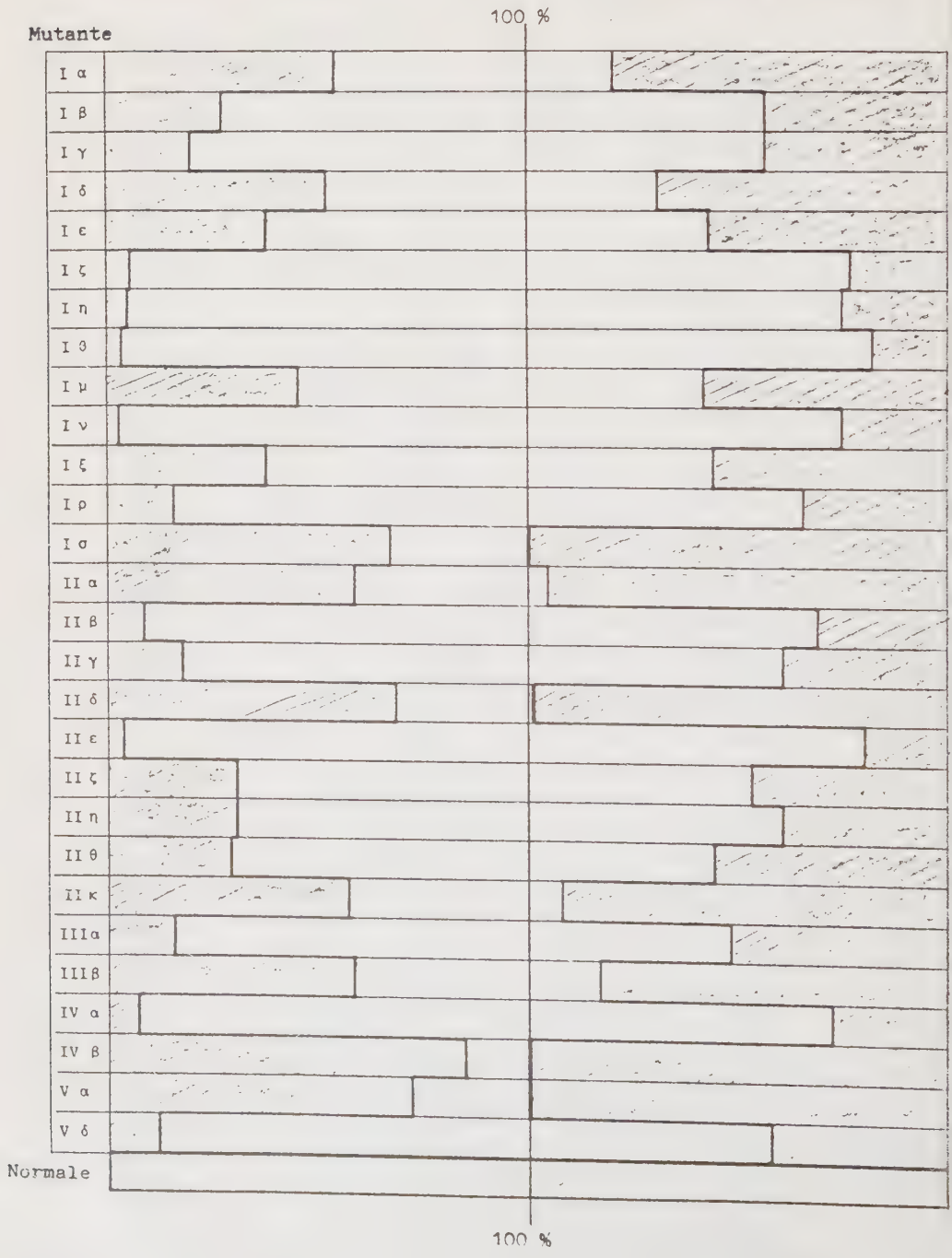
Die graphische Darstellung der Tabelle 1 zeigt die Pigmengehalte der Mutanten in bezug zur Normalen (=100%).

Tabelle 1

Mutante	Gesamtchlorophyll (a+b) in % des TG	Gesamtchlorophyll (a+b) in % der No	Carotinoide % TG	Carotinoide % No	Verhältnis der Chlorophylle a:b
I α	0,427	55	0,123	79	2,27
I β	0,221	28	0,069	44	3,03
I γ	0,155	20	0,068	44	1,97
I δ	0,411	53	0,107	69	2,04
I ε	0,296	38	0,089	57	1,92
I ζ	0,048	6	0,037	24	0,69
I η	0,038	5	0,040	26	1,31
I θ	0,030	4	0,030	19	0,97
I μ	0,354	46	0,090	58	2,02
I ν	0,021	3	0,040	26	3,20
I ξ	0,293	38	0,088	56	1,97
I ρ	0,122	16	0,054	35	1,41
I σ	0,528	68	0,168	107	2,43
II α	0,458	59	0,148	95	2,79
II β	0,073	9	0,050	32	1,81
II γ	0,137	18	0,062	40	1,96
II δ	0,534	69	0,154	99	1,68
II ε	0,029	4	0,033	21	3,29
II ζ	0,240	31	0,073	47	2,18
II η	0,237	31	0,063	40	1,60
II θ	0,223	29	0,088	56	2,87
II κ	0,446	57	0,144	92	2,15
III α	0,127	16	0,081	52	3,69
III β	0,458	59	0,130	83	1,88
IV α	0,051	7	0,046	29	2,43
IV β	0,658	85	0,181	116	2,52
V α	0,556	72	0,155	100	2,13
V δ	0,091	12	0,067	43	2,14
Normale	0,776	100	0,156	100	1,88

Graphische Darstellung zu Tabelle 1

Gesamt-Chlorophyll (a+b) bzw. Carotinoide in % der Normalen



Möglicherweise ist dieser kritische Bereich im Chlorophyllgehalt jedoch bei den hier bearbeiteten Mutanten nicht gültig, da bei ihnen normale Verhältnisse nicht ohne weiteres angenommen werden können. Solche Normalverhältnisse setzen die ungehinderte Verwertbarkeit der absorbierten Strahlungsenergie voraus, die wiederum von einer besonderen räumlichen Anordnung der Pigmente abhängt. Da die Pigmente der Chloroplasten in deren Thylakoiden lokalisiert sind, ist ihre Anordnung von der Ordnung dieser Lipoproteidmembranen bestimmt und eben diese Ordnung ist bei den untersuchten Photosynthese-defekten Plastom-Mutanten, wie bereits angedeutet, fraglich.

Auf keinen Fall kann bei den 10 Mutanten, deren Chlorophyll-Defekt offensichtlich gravierender ist, diese Defizienz ursächlich für die Letalität der Mutanten verantwortlich sein. Das haben die Untersuchungen von KUTZELNIGG et al. (1975a) gezeigt: diese Mutanten gehören alle den Gruppen 1a, 1b und 2a an (vgl. Abb. 1 ebenda), die durch besonders weitreichenden und raschen Abbau des Thylakoidsystems charakterisiert sind, bei denen jedoch diese Plastiden-Degeneration nur in entsprechend frühere Entwicklungsstadien der Blätter vorverlegt ist.

Somit muß man auch bei diesen besonders bleichen Mutanten von auf früher Entwicklungsstufe ursprünglich vorhandenen Plastiden mit flächigen, gestapelten, nicht angeschwollenen Thylakoiden ausgehen, die erst sekundär vesikelartig anschwellen, degenerieren, zahlenmäßig vermindert und schließlich ganz aufgelöst werden (vgl. KUTZELNIGG et al. 1975a).

Bei zumindest 18 der untersuchten Mutanten lassen die Ergebnisse sicher erkennen, daß die Ursache für die unzureichende Vitalität der Mutanten nicht in ihrem Pigmentmuster liegt. Gegen diese Möglichkeit sprechen bei diesen Mutanten sowohl der Anteil des Gesamtchlorophylls am Gesamttrockengewicht wie auch das Verhältnis der Chlorophylle a und b zueinander, das in der Regel um 2, mitunter auch bei 2-3 liegt (Tab.1).

Bei den besagten 18 Mutanten, bei welchen der Pigmentgehalt auf 18-85% des Normalen reduziert ist, scheint schon deswegen der Pigmentmangel eher ein Sekundäreffekt der Mutation als direkt mit dieser verknüpft zu sein, weil bei ihnen der Pigmentgehalt in jungem Gewebe höher ist als in älterem Blattgewebe mit mutierten Chloroplasten (vgl. KUTZELNIGG et al. 1975a+b).

Auch läßt der deutliche Einfluß der Kulturbedingungen auf Wachstum und Ausbleichungsgrad der Mutanten bereits vermuten, daß ihre Letalität nicht primär durch Fehler im Pigmentmuster bedingt ist: Anzucht unter Schwachlicht-bedingungen an feuchten Standorten läßt meist auch die mit mutierten Plastiden ausgestatteten Blätter zu normaler Größe heranwachsen.

Wie wir inzwischen durch entsprechende elektronen-mikroskopische Untersuchungen von Oenothera-Mutanten verschiedenen Alters wissen (KUTZELNIGG et al. 1975a), zögert Schwachlicht-Anzucht die photooxidative Zerstörung der Chloroplasten-Feinstruktur hinaus, die wir ansonsten bei diesen Plastom-Mutanten in der Regel finden. Solche Zerstörung derjenigen Strukturen, an welche die Pigmente gebunden sind, kennen wir als lichtbedingte Sekundäreffekte bei Photosynthese-defekten Mutanten allgemein (STUBBE und v. WETTSTEIN 1955, DOLZMANN 1968, KUTZELNIGG et al. 1975a, b).

A. Untersuchung des Calvin Zyklus

2a. Warburg-Manometrie

Zur weiteren physiologischen Charakterisierung der Plastom-Mutanten wurden anfangs auf der Suche nach einem etwaigen - genetisch bedingten - Block im Photosynthese-Mechanismus Atmung und Photosynthese von Mutanten und vergleichweise von unmutiertem Blattgewebe manometrisch untersucht: mit Hilfe der Warburg-Technik wurden Sauerstoff-Bilanzen im Licht-Dunkel-Wechsel gemessen.

Normale Blätter zeigten unter den Versuchsbedingungen eine positive Stoffbilanz mit einer Netto-Photosynthese-Leistung

von ca. 30 µmol CO_2-Assimilation pro mg Chlorophyll und Stunde.

Demgegenüber zeigte sich die Photosynthese-Leistung auch grüner Mutanten (I_γ, I_δ, II_α, II_γ) stark reduziert, wie die Sauerstoffbilanz-Kurven in Abb. 1 deutlich zeigen. Trotz der Unterschiede quantitativer Art von Mutante zu Mutante überwiegt doch bei allen vier Mutanten die Atmung stark die Photosynthese. Diese negative Stoff- bzw. O_2-Bilanz wird durch den Licht-Dunkel-Wechsel wenig oder nicht beeinflußt.

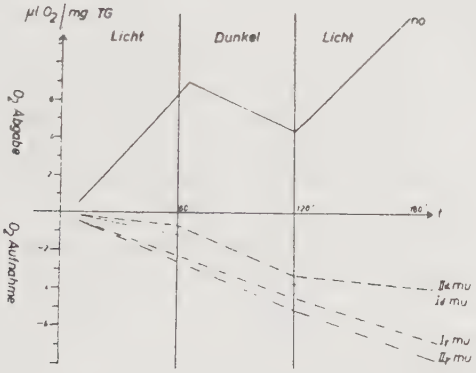


Abb.1: O_2-Bilanz von Blattgewebe mit normalen und mutierten Chloroplasten im Licht-Dunkel-Wechsel.
Bedingungen: Hauptraum der Warburg-Gefäße m/10 $Na_2CO_3/NaHCO_3$ (1:9). Einsatz: ca. 50 mg Normale (no) bzw. ca. 200mg Mutante (mu).
(Die O_2-Abgabe der Normalen zu Beginn der Dunkelphase beruht auf einem Fehler der Ablesetechnik).

2b. CO_2-Gaswechsel-Messungen mit dem Infrarot-Analysator

Auf der Suche nach Anhaltspunkten für eine mögliche Störungstelle im Photosynthese-Mechanismus wurden später an Stelle der O_2-Bilanz mit Hilfe der Warburg-Manometrie CO_2-Gaswechsel-Messungen vorgenommen, durch welche sich die CO_2-Bilanz, d.h. Atmung und photosynthetische Leistungs-

fähigkeit von Blättern in situ im Licht-Dunkel-Wechsel direkt feststellen läßt.

Bei dem bereits beschriebenen Versuchsaufbau (HALLIER und HEBER 1977) entspricht eine Änderung des Gehalts an CO_2 im Gasstrom um 1ppm der Produktion bzw. dem Verbrauch von 0,34 µmol CO_2 pro Stunde, d.h. die Atmungs- bzw. Photosyntheserate ist direkt ablesbar.

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der CO_2-Gaswechselmessungen im Licht-Dunkel-Wechsel von Blättern der verschiedenen Mutanten im Vergleich zu Blättern mit unmutierten Chloroplasten.

Belichtung mit sättigendem Weißlicht führt bei nur zwei Mutanten (IIα und IVβ) zu signifikanter Photosynthese-Leistung, eine dritte Mutante (IIδ) zeigt schwache photosynthetische CO_2-Aufnahme.

Bei allen übrigen Mutanten ist die Bilanz negativ, jedoch mit quantitativen Unterschieden: während bei einigen von Ihnen (z.B. Iδ, Iξ) die CO_2-Bilanz durch Licht-Dunkel-Wechsel nicht beeinflußt wird, führt bei einer Reihe von Mutanten (z.B. IIδ, IIα) die Belichtung zur Verringerung der Atmung oder zu geringer photosynthetischer Aktivität, bei einer größeren Zahl führt die Belichtung dagegen zu einer deutlichen Atmungserhöhung (z.B. Iε, Iυ).

Somit läßt die Tabelle 2 zunächst nur die Aussage zu, daß der Photosynthese-Mechanismus aller Mutanten - mit Ausnahme von IVβ und möglicherweise auch von IIα, für deren Verständnis es weiterer Daten bedarf - unzureichend funktioniert, d.h. daß Mutantengewebe mangels ausreichender autotroph erzeugter Kohlenhydrate "verhungert", sofern es nicht durch normal grünes Gewebe miternährt wird. Offensichtlich gibt es jedoch unter den Mutanten verschiedene Typen, die sich erst auf Grund zusätzlicher Untersuchungsergebnisse verstehen und voneinander unterscheiden lassen.

Tabelle 2: CO_2-Gaswechsel-Messungen an Mutanten und Wildtyp mit dem Infrarot-Analysator im Licht bzw. im Dunkeln in µmol x $(mg\ TG)^{-1}$ x h^{-1}.

Tabelle 2

	Dunkelatmung	Atmung bzw. Photosynthese (-) im Licht (540 W/m^2 Weißlicht)	Dunkelatmung anschließ.
	in µmol × (mg TG)$^{-1}$ × h^{-1}		
I α	nicht gemessen		
I β	0,069	0,104	0,046
I γ	0,099	0,148	0,046
I δ	0,062	0,062	0,062
I ε	0*	0,262	0*
I ζ	nicht gemessen		
I η	0,062	0,086	0,062
I θ	0,060	0,097	0,060
I µ	0	0,117	0,064
I ν	0,102	0,115	0,102
I ξ	0,020	0,020	0,020
I ρ	0,059	0,067	0,059
I σ	0,072	0*	0,072
II α	0,038	- 0,039	0,036
II β	0,127	0,136	0,127
II γ	0,005	0,109	0,005
II δ	0,028	- 0,003	0,028
II ε	0,066	0,066	0,045
II ζ	0,043	0,069	0,044
II η	0,099	0,173	0,054
II θ	0,115	0,150	0,048
II κ	nicht gemessen		
III α	0	0,043	0
III β	0,073	0,073	0,053
IV α	0,036	0,064	0,037
IV β	0,091	- 0,054	0,110
V α	0,098	0	0,098
V δ	0,052	0,052	0
Normale	0,040	- 0,171	0,040

* 0 - [illegible]

Generell liegt die CO_2-Produktion der Mutanten im Dunkeln in einer üblichen und mit der Dunkelatmung der Normalen vergleichbaren Größenordnung, d.h. bei etwa 5-10 µmol CO_2 x (mg Chlorophyll)$^{-1}$ x h^{-1}, normalen Chlorophyllgehalt von 0,9% des Trockengewichtes - wie bei der Normalen gemessen - unterstellt.

An dieser Stelle wird ein Problem deutlich, welches praktisch auch für alle weiteren Teilbereiche der Untersuchung Chlorophyll-defizienter Mutanten von Bedeutung ist: das richtige Bezugssystem zum Vergleich von Leistungen im Bereich der Photosynthese, sei es nun die photosynthetische Fixierungsrate, die Atmungsintensität oder die Messung von Enzymaktivitäten.

Diese Leistungen werden in der Regel auf den Chlorophyllgehalt als Grundlage für Leistung im photosynthetischen Bereich bezogen. Diese Bezugsgröße führt jedoch bei Geweben, welche Chloroplasten mit defektem Membransystem und entsprechend verringertem oder verändertem Chlorophyllgehalt besitzen, zu Verfälschungen bzw. zu Leistungsdaten, die - auf sehr geringe Chlorophyllmengen bezogen - wesentlich zu hoch liegen.

In Tabelle 2 wird dieses Problem der richtigen Bezugsgröße durch Bezugnahme auf das Trockengewicht umgangen, da sich sonst - bezieht man auf den Chlorophyllgehalt, wie ansonsten üblich - wesentlich zu hohe Raten ergäben. Diese Raten würden naturgemäß umso unrealistischer, je Chlorophyll-ärmer die Mutanten sind.

3. Assimilation von $^{14}CO_2$

Messungen mit der Warburg-Apparatur bzw. mit dem Infrarot-Absorptions-Analysator liefern lediglich Daten zur O_2- bzw. CO_2-Bilanz.

Direkte Aussagen über das CO_2-Assimilationsvermögen von Blattgewebe erlauben Markierungsversuche mit $^{14}CO_2$ während der Photosynthese: Fütterung des Blattmaterials mit $^{14}CO_2$ unter Belichtung führt zum Einbau des markierten Kohlenstoffes in die Produkte der Photosynthese.

Aus der spezifischen Aktivität des gebotenen Kohlenstoffes und der Fixierungsrate läßt sich die Intensität dieser Assimilation bestimmen.

In günstigen Fällen erlaubt darüber hinaus der Einbau des ^{14}C in bestimmte Photosynthese-Produkte Rückschlüsse für die Lokalisation eines Defektes im Ablauf der Photosynthese: ist ein Glied einer Reaktionskette defekt bzw. blockiert, so sollte es zu einer charakteristischen Anhäufung desjenigen Zwischenproduktes kommen, welches durch die Hemmung nicht oder deutlich langsamer umgesetzt wird.

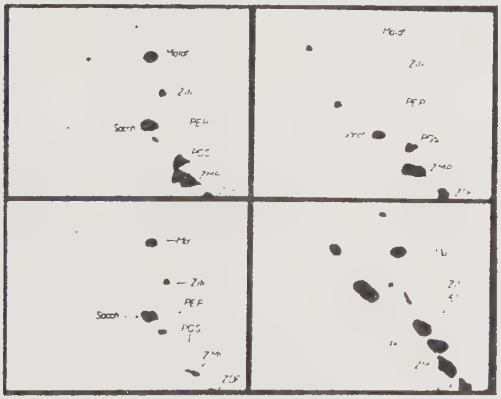


Abb.2a: Autoradiographien ^{14}C-markierter Photosyntheseprodukte aus Blattsegmenten mit mutierten bzw. mit normalen Chloroplasten nach 10 min. Photosynthese in Gegenwart von $^{14}CO_2$ in sättigendem Weißlicht (Bedingungen s. HALLIER et al. 1968).

Links oben: Mutante IIα rechts oben: Mutante Iδ
Links unten: Mutante Iγ rechts unten: Normale

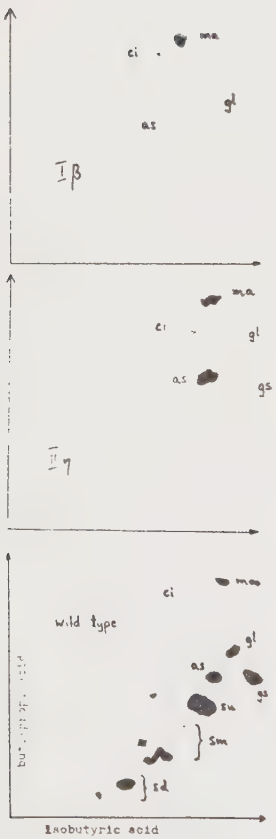


Abb.2b: Autoradiographien der ^{14}C-markierten Photosyntheseprodukte der Mutanten Iß und II_7 sowie des Wildtyps nach 10 min. Photosynthese in Gegenwart von $^{14}CO_2$ in sättigendem Weißlicht (Bedingungen s. HALLIER und HEBER 1977).

Die deutliche Markierung von Glycin/Serin bei der Mutanten Iß erscheint aus technischen Gründen nicht auf der Abbildung.

Abkürzungen:
as = Aspartat
ci = Citrat
gl = Glutamat
gs = Glycin/Serin
ma = Malat
su = Saccharose
sd = Zuckerbisphosphate
sm = Zuckermonophosphate

Typische Autoradiographien der ^{14}C-markierten Produkte der Photosynthese mehrerer Mutanten sowie vergleichsweise normalen ("Wildtyp") Blattgewebes zeigen die Abb. 2a + 2b.

Hier wird deutlich, daß bei einem Teil der Mutanten (vgl. Abb. 2a) das Verteilungsmuster markierter Verbindungen qualitativ dem der Normalform weitgehend entspricht, daß sogar Phosphoglycerat und mitunter - dann allerdings sehr schwach - Zuckermono- und bisphosphate radioaktiv markiert werden. Wesentlich ist jedoch, daß es zu keinem stärkeren

^{14}C-Einbau in Photosynthese-Endprodukte wie Saccharose kommt. Charakteristische Anhäufungen eines Intermediärproduktes der Photosynthese, aus denen sich Rückschlußmöglichkeiten zur Lokalisation eines Defektes ergäben, lassen sich bei diesem für die meisten Mutanten typischen Verteilungsmuster nicht erkennen.

Allerdings spricht bereits die bei derartigen Mutanten feststellbare Bildung phosphorylierter Photosynthese-Intermediärprodukte wie vor allem Phosphoglycerat und Zuckerbisphosphate für das Vorhandensein und Funktionieren des Enzymbestecks des photosynthetischen Carbon-Zyklus.

Deutlich hiervon unterscheiden läßt sich eine Gruppe von Mutanten, deren autoradiographisches Verteilungsmuster Abb. 2b zeigt: hier differiert die Skala der markierten Photosynthese-Produkte drastisch von der des normalen Gewebes, welches nach 10 min. Photosynthese einen hohen ^{14}C-Anteil in Zuckerphosphate eingebaut und während dieser Zeit auch deutlich Saccharose synthetisiert hat.

Bei den hier beispielsweise gezeigten Mutanten Iß und IIn dagegen findet sich eingebautes ^{14}C vorwiegend in organischen Säuren wie Äpfelsäure und Zitronensäure bzw. in Aminosäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin und Serin, was auf mögliche CO_2-Inkorporation über den Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Weg hindeutet.

In Tabelle 3 sind die Daten zur Assimilation von $^{14}CO_2$ durch Blattgewebe der verschiedenen Mutanten sowie zum Vergleich durch Blattgewebe mit unmutierten Chloroplasten zusammengestellt.

Tabelle 3: Absolute und relative ^{14}C-Fixierungsdaten von Blattsegmenten mit mutierten bzw. mit unmutierten Chloroplasten.

Gesamt-Fixierungsleistungen und Verteilung des in bestimmten Photosynthese-Produkten bzw. -Produktgruppen wiedergefundenen ^{14}C nach 10 min. Photosynthese in Anwesenheit von $^{14}CO_2$ in sättigendem Weißlicht. (Bedingungen s. HALLIER et al. 1968, HALLIER und HEBER 1977).

Tabelle 3

	Gesamt-Chloroph. in % TG	Fix.v. $^{14}CO_2$ in µmol × (mg TG)$^{-1}$ × h^{-1}	Fixierg. in % der Normalen	Eingebautes ^{14}C in 10^{-3} µmol × (mg TG)$^{-1}$ × h^{-1} in: ZDP	ZMP	PGS	Sacch.	Asp+Glut+ Citr+Mal	glyc ser ala	%-Anteil am ^{14}C-Einbau in: ZDP	ZMP	PGS	Sacch.	Asp+Glut+ Citr+Mal	glyc ser ala
I α	0,43	0,0146	3,2	0,97	2,27	1,77	0,42	3,27	1,10	9,08	21,34	16,64	3,96	30,89	10,30
I β	0,22	0,0014	0,3	0	0,03	0,01	0	1,20	0,07	0	1,47	0,72	0	91,64	5,43
I γ	0,16	0,0022	0,5	0,09	0,19	0,07	0,03	1,38	0,05	5,04	10,41	3,80	1,77	75,10	2,52
I δ	0,41	0,0018	0,4	0,11	0,23	0,15	0,10	0,26	0,10	11,38	24,17	16,11	10,71	27,30	10,33
I ε	0,30	0,0009	0,2	0,03	0,05	0,01	0,14	0,46	0,14	3,08	5,44	1,46	16,62	54,23	16,71
I ζ	0,05	0,0011	0,2	0	0	0	0	0,57	0,02	0	0	0	0	97,29	3,12
I η	0,04	0,0015	0,3	0	0	0	0	1,05	0,02	0	0	0	0	95,27	2,51
I θ	0,03	0,0008	0,2	0,01	0,03	0,01	0,01	0,63	0,09	1,41	4,11	1,50	1,50	75,23	10,55
I ι	0,35	0,0009	0,2	0,02	0,05	0,02	0,02	0,21	0,15	4,05	8,29	3,92	3,27	42,75	30,60
I ν	0,02	0,0013	0,3	0,01	0,08	0,01	0,01	0,44	0,18	1,78	10,16	0,94	0,79	55,65	22,35
I ξ	0,29	0,0012	0,3	0	0	0	0	0,34	0,15	0	0	0	0	69,01	30,98
I ρ	0,12	0,0031	0,7	0,05	0,13	0,03	0,05	1,01	0,09	3,47	9,23	1,76	3,56	70,39	5,99
I σ	nicht gemessen														
II α	0,46	0,0058	1,3	0,35	1,05	0,16	0,17	1,10	0,17	11,39	33,89	5,05	5,47	35,39	5,36
II β	0,07	0,0018	0,4	0,07	0,18	0,02	0,10	0,54	0,36	5,35	14,34	1,19	8,13	42,26	27,78
II γ	0,14	0,0009	0,2	0	0	0	0	0,45	0,03	0	0	0	0	88,50	5,51
II δ	0,53	0,0064	1,4	0,31	0,97	0,21	0,16	1,30	0,75	7,14	22,42	4,88	3,77	30,39	17,49
II ε	0,03	0,0021	0,5	0,10	0,33	0,10	0,05	1,02	0,17	5,34	17,81	5,29	2,60	55,79	9,61
II ζ	0,24	0,0016	0,4	0	0	0	0	0,91	0,04	0	0	0	0	93,75	3,70
II η	0,24	0,0044	1,0	0	0	0	0	3,74	0,19	0	0	0	0	93,12	4,62
II θ	0,22	0,0020	0,4	0,03	0,14	0,02	0,03	1,54	0,05	1,60	7,94	0,84	1,45	84,43	1,59
II κ	0,45	0,0251	5,6	1,51	3,92	0,69	0,74	1,99	3,10	11,02	28,48	4,97	5,35	14,42	22,61
III α	nicht gemessen														
III β	0,46	0,0251	5,6	2,05	8,64	1,00	2,02	5,25	2,83	9,20	38,82	4,47	9,09	23,56	12,72
IV α	0,05	0,0025	0,6	0,08	0,34	0,10	0,07	1,07	0,12	4,34	19,02	5,42	3,85	60,35	6,52
IV β	0,66	0,0691	15,4	4,97	10,30	4,95	8,11	12,22	3,47	11,08	22,97	11,02	18,08	28,53	7,72
V α	0,56	0,0033	0,7	0,13	0,35	0,08	0,17	2,21	0,04	4,57	11,65	2,56	5,49	72,66	1,38
V δ	0,09	0,0014	0,3	0	0	0	0	1,52	0,07	0	0	0	0	95,32	4,14
Norm.	0,78	0,4498	100,0	20,12	21,35	2,94	109,12	47,40	43,97	8,95	9,49	1,31	48,49	10,83	19,55

Die Tabelle zeigt neben dem für die Beurteilung der Assimilationsleistung wichtigen Gesamtchlorophyllgehalt der Mutanten in % Trockengewicht (Spalte 1) ihre $^{14}CO_2$-Gesamt-Fixierungsleistung in µmol, ebenfalls auf Trockengewicht bezogen (Spalte 2) und auch die jeweilige Fixierungsleistung im Vergleich zur Normalform (Spalte 3).

Die Spalten 4-9 zeigen die in bestimmten Photosynthese-Produkten bzw. -Produkt-Gruppen wiedergefundenen Mengen an ^{14}C in 10^{-3} µmol, die Spalten 10-15 den prozentualen Anteil eben dieser Photosynthese-Produkte am insgesamt eingebaut wiedergefundenen ^{14}C.

Die Summe der Spalten 4-9 ergibt deshalb nicht den in Spalte 2 angegebenen Wert, weil dieser die gesamte fixierte Aktivität vor Auftrennung wiedergibt, während in den Spalten 4-9 nur ein Teil der insgesamt markierten Verbindungen festgehalten wurde: z.T. liegen weitere ^{14}C-markierte Verbindungen außerhalb des Autoradiogrammes, z.T. wurden sie nicht unter die tabellarisch erfassten wichtigeren Verbindungen aufgenommen. Aus letzterem Grund ergeben auch die in den Spalten 10-15 angegebenen Prozentzahlen (die sich auf die Gesamtheit der auf dem Autoradiogramm wiedergefundenen Aktivität bezieht) nicht 100%.

Diese tabellarische Zusammenstellung der assimilatorischen Leistungen der Mutanten im Vergleich zur Normalen und der Verbleib des aufgenommenen ^{14}C in den verschiedenen Verbindungen bzw. Stoffgruppen bringt eine Reihe von Daten, welche - obgleich sie nur relative Werte der gesamten Kohlenstoff-Fixierung wiedergeben - für die weitere Beurteilung der Mutanten bedeutsam sind.

Zunächst zeigt die Spalte 3, daß die Fixierungsraten der meisten Mutanten unter 1% der Normalen-Leistung liegen. Nur wenige der Mutanten erreichen 1-5% und nur eine einzige (IVß) kommt auf über 10% dieser Normalleistung. Dies, obwohl - wie in Tabelle 1 bereits festgehalten und angesprochen - die meisten Mutanten auf Grund ihres Chlorophyllgehaltes zu einer höheren Leistung fähig wären.

Andererseits zeigt sich, daß der größte Teil der Mutanten - wenn auch in geringen Mengen - sowohl Zuckerbisphosphate wie auch Saccharose zu bilden vermag. Doch ist auffällig, daß auch hier keine direkte Relation zwischen dem Bleichheitsgrad und dem Vermögen zur photosynthetischen ^{14}C-Verarbeitung besteht: auch in der Gruppe der extrem bleichen Mutanten existieren neben solchen Formen, die keine markierten Photosynthese-Folgeprodukte wie Phosphoglycerat-Zuckermonophosphate-Zuckerbisphosphate-Saccharose aufzuweisen haben, auch solche, bei denen diese Kette der Intermediärprodukte zur Saccharose hin schwach, aber signifikant durchmarkiert ist (z.B. Iζ, Iη gegenüber Iν, Iυ).

Andererseits gibt es diese beiden Typen auch unter den nicht unter sichtlicher Chlorophylldefizienz leidenden Mutanten (z.B. IIζ, IIη gegenüber Iυ, IIδ).

Ein auffallend besseres Assimilationsvermögen zeigt eine Gruppe von vier Mutanten (Iα, IIκ, IIIβ und IVβ) mit Leistungen zwischen 3 und 15% des Normalen, die sich bereits in der Anzucht insofern aus dem Sortiment herausheben, als sie allein im Gegensatz zu den übrigen, lichtempfindlicheren Typen nach der eingangs beschriebenen Kombination mit einem Wildtyp auf dem Kreuzungswege auch im Freiland, d.h. unter Starklichtbedingungen gezogen werden können.

Diese Gruppe der vier relativ vital wirkenden Mutanten hebt sich nicht nur durch ihre deutlich höhere Photosynthese-Leistung vom gesamten Sortiment ab, sondern auch durch den entsprechend stärkeren ^{14}C-Einbau in Zuckerphosphate sowie vor allem durch die bei diesen vier Mutanten zutage tretende ^{14}C-Verteilungsrelation des Kohlenstoff-Einbaues in Zuckerphosphate und organische Säuren bzw. Aminosäuren wie Malat, Citrat, Aspartat und Glutamat. Der in den Di- und Tricarboxylsäuren aber auch fixierte Anteil an ^{14}C in Höhe von 15-30% liegt deutlich höher als der entsprechende Wert bei den Normalen mit ca. 10% Anteil an der Gesamtfixierung. Der Vergleich

zeigt jedoch auch, was dieser Verschiebung der Relationen unter den Photosynthese-Folgeprodukten zugrunde liegt: es kommt vor allem nur zu einer sehr geringen Akkumulation von ^{14}C in Photosynthese-Endprodukten wie Saccharose, deren Anteil bei normalen Pflanzen bereits nach 10 min Photosynthese (vgl.Tab.3) sehr hoch ist. Die extrem schwache ^{14}C-Markierung der Saccharose bedingt bei den Mutanten in erster Linie den relativ hohen prozentualen Anteil markierter Photosynthese-Intermediärprodukte und markierter Aminosäuren sowie organischer Säuren an der Gesamt-$^{14}CO_2$-Fixierung.

Wahrscheinlich darf man davon ausgehen, daß die Absolutraten des Einbaues von Kohlenstoff in die letztgenannten Gruppen von Verbindungen (vermutlich über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Reaktion) bei den Mutanten nicht oder nicht wesentlich im Vergleich zu den Raten normaler Pflanzen verändert sind. Die niedrigen Photosynthese-Raten lassen jedoch die Raten der Markierung organischer Säuren relativ stark ansteigen, in einigen Fällen auf über 90% des gesamten ^{14}C-Einbaues (vgl.Tab.3: z.B. Iζ, Iη)!

Daß wir es bei diesen vier Mutanten mit den am wenigsten geschädigten Plastom-Mutanten zu tun haben, zeigt auch ihre Einordnung in die Gruppe 3 bei KUTZELNIGG et al. (1975b), in welcher die Mutanten mit regelmäßiger Granabildung, relativ guter Thylakoidausbildung und mit nur geringer Degeneration in alten Blättern zusammengefaßt sind.

Andererseits läßt sich auch aus diesen Gemeinsamkeiten höchstwahrscheinlich keine Defekt-Verwandtschaft der vier ableiten. Darauf deutet stark die Tatsache hin, daß bei Kutzelnigg zu dieser Gruppe auch von der Assimilationsleistung her ganz anders zu beurteilende Mutanten wie Iδ, IIα , IIδ und Vα gezählt werden.

Die Informationen der Tabelle 3 lassen generell die folgenden 4 Rückschlüsse zu:

I. Die Daten belegen zum Assimilationsvermögen der Mutanten den bereits aus den Pigment-Analysen (Tabelle 1) gezogenen Schluß, daß Art und Gewichtigkeit des Defektes bei den einzelnen Mutanten sicherlich nicht in direktem Zusammenhang mit dem jeweiligen Chlorophyllgehalt stehen.

II. Die Relation des ^{14}C-Einbaues in Zuckerphosphate bzw. Saccharose zum Einbau in organische Säuren und Aminosäuren liefert ein aufschlußreiches Kriterium für das Funktionieren der Photosynthese bei den einzelnen Mutanten: einer Verringerung bzw. einem Fehlen des Saccharose-Pools entspricht stets ein starker Anstieg des relativen Anteils des ^{14}C-Gesamteinbaues bei Citrat, Malat, Aspartat und Glutamat; dieser prozentuale Anteil des ^{14}C-Einbaues in diese Verbindungen ist umso höher, je weniger radioaktiver Kohlenstoff sich in den Zuckerphosphaten wiederfindet, d.h. je niedriger die Einbaurate des ^{14}C in die Photosynthese-Produkte ist. Zu den (relativ) extrem hohen Raten des ^{14}C-Einbaues in die Verbindungen der Spalte 14 - bis 97% der Gesamtfixierung - kommt es nur dann, wenn der lichtabhängige $^{14}CO_2$-Einbau nicht oder vernachlässigbar schlecht funktioniert und wenn sich infolgedessen Markierung in den Zuckerphosphaten kaum, im Saccharose-Pool gar nicht mehr findet: möglicherweise läuft dann eine - absolut gesehen sehr geringe - Dunkelfixierung über die PEP-Carboxylase allein ab und die gesamte Fixierung des gebotenen $^{14}CO_2$, die überhaupt stattfindet, erfolgt auf diesem Wege.

III. Die Verteilungsmuster markierter Verbindungen zeigen zumindest in all den Fällen, in welchen es zur deutlichen Zuckerbisphosphat-Markierung kommt: zunächst darf davon ausgegangen werden, daß die Mutanten über das für den Calvin-Zyklus, den reduktiven Pentosephosphatzyklus notwendige Enzymbesteck verfügen. Eventuell vorhandene Defekte in der Reaktionskette des photosynthetischen Carbon-Zyklus können höchstens limitierende, keine blockierende Wirkung haben.

Diese Schlußfolgerung gilt allerdings nur beschränkt, d.h. nur für die Mutanten, deren Gesamt-Fixierung so hoch liegt, daß auch bei Inbetrachtziehung von CO_2-Fixierung auf nicht-photosynthetischem Wege (Pyruvat-Carboxylierung) von zusätzlicher $^{14}CO_2$-Fixierung per Photosynthese ausgegangen werden darf.

Auf diesen Punkt der grundsätzlichen Präsenz aller für den Ablauf des reduktiven Pentosephosphatzyklus notwendigen Enzyme wird im nächsten Abschnitt noch ausführlicher eingegangen.

Bei den Mutanten mit insgesamt niedriger, jedoch auch für die Photosynthese-Intermediärprodukte bis hin zu den Zuckerphosphaten geltender ^{14}C-Markierung liegt der Verdacht der $^{14}CO_2$-Fixierung auf nicht-photosynthetischem Wege schon deswegen nahe, weil wir in diesen Fällen auch stets eine deutliche Markierung von Verbindungen des Citrat-Zyklus wie Citrat und Malat finden. Die ergänzenden Dunkelversuche hierzu fehlen bisher noch.

IV. Zu der bereits angeschnittenen Frage, ob sich eventuell aus den Verteilungsmustern und -daten der ^{14}C-Markierungen Rückschlüsse auf Defektstellen im Ablauf der Photosynthese-Reaktionskette ziehen lassen, ist festzuhalten: in den Fällen, in denen überhaupt markierte Produkte des Kohlenhydrat-Stoffwechsels zu finden sind, werden die Markierungs- und damit die Einbauraten relativ zu den Daten der Normalen umso geringer, je näher man den Endprodukten der Photosynthese kommt. Dies bedeutet, daß Saccharose nicht nur absolut, sondern auch relativ zu ihrem eigentlich zu erwartenden Anteil an der Gesamtfixierung am wenigsten markiert ist, während der prozentuale Anteil der PGS-Markierung an der Gesamtfixierung nicht nur absolut höher liegt, sondern auch relativ, d.h. bei Zugrundelegung ungestörter Markierungsrelationen nach 10 min. Photosynthese, sehr hoch ist.

Das bedeutet, daß bei diesen Mutanten die gesamte Rest-Photosynthese sehr träge bzw. sogar im Verlauf der

Reaktionskette zunehmend gebremst abläuft. Das bedeutet auch, daß es zum normalen Auffüllen der Pools des Calvin-Zyklus nicht kommt. So lassen sich die relativ hohen, mit Fortschreiten des Kohlenhydrat-Aufbaues zunehmend relativ geringer werdenden Markierungs-, d.h. Umbauraten - die mit dem Endprodukt Saccharose ihren niedrigsten Stand erreichen - am besten interpretieren.

Zusätzlich zu diesen vier Rückschlüssen ergibt sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus den Daten der Tabelle 3 - darauf deuten die unterschiedlichen ^{14}C-Verteilungsrelationen bei unterschiedlichem Pigmentgehalt und unterschiedlichen Mutanten-Typen (KUTZELNIGG et al. 1975b) hin - daß man bei dem vorliegenden Mutanten-Sortiment mit einer Vielzahl verschiedenartiger Defekte im Photosynthese-Mechanismus rechnen muß, d.h. mit qualitativ und im Ansatzpunkt verschiedenen Defekten, nicht aber mit Blocks, die alle an der gleichen Stelle angreifen und nur quantitativ unterschiedlich stark ausgeprägt in Erscheinung treten.

4. Untersuchung der Photosynthese-spezifischen Enzyme

Bei den meisten Mutanten spricht die Bildung phosphorylierter Intermediärprodukte der Photosynthese wie vor allem Phosphoglycerat und Zuckerbisphosphate dafür, daß das Enzymbesteck des photosynthetischen Carbon-Zyklus vorhanden ist (vgl. Tabelle 3).

Da dies jedoch für einen Teil der untersuchten Mutanten nicht gilt und außerdem selbst bei den Mutanten mit qualitativ normalem Verteilungsmuster der Photosynthese-Produkte ein enzymatisch bedingter, sich quantitativ auswirkender Defekt in Erwägung gezogen werden muß, wurden im folgenden der Bestand und die Aktivität von Teilen des Carbon-Zyklus und vor allem der Photosynthese-spezifischen Enzyme untersucht.

Der Weg, den der als CO_2 aufgenommene Kohlenstoff von der Bindung des CO_2 an den Acceptor Ribulose-1,5-bisphosphat bis zur endgültigen Umwandlung in Kohlenhydrat zurücklegt, führt über eine Folge von mehr als einem Dutzend enzymkatalysierter Reaktionen.

Von diesen Enzymreaktionen kommen die meisten auch in nicht photosynthetisch aktiven Zellen vor, wo sie an den Reaktionen des oxidativen Pentosephosphat-Zyklus und der Glykolyse beteiligt sind. Lediglich drei der Enzyme sind Photosynthese-spezifisch und nur in grünen Zellen autotropher Organismen zu finden. Es sind dies

a) die NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13),
b) die Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19) und
c) die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (früher Carboxidismutase, EC 4.1.1.39).

Wie bereits an anderer Stelle beschrieben (HALLIER et al. 1968), zeigte es sich, daß der Ablauf der in vitro zu untersuchenden Reaktionen der genannten Enzyme zunächst durch offenbar bei der Homogenisation freiwerdende Hemmstoffe (Gerbstoffe) blockiert wurde. Als wirksamster der getesteten Schutzstoffe erwies sich - vor dem Homogenisieren zugegeben - Polyvinylpyrrolidon (MG z.B. 40.000 Daltons). Diese Substanz hemmt selbst in relativ hohen Konzentrationen Enzymreaktionen nicht nennenswert (ca. 20% Hemmung z.B. der Phosphoglycerat-Kinase/Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion (EC 2.7.2.3. / EC 1.2.1.13) erst bei 8,5 mg PVP pro ml Extrakt).
PVP schützt offenbar die Amid-Gruppen der Enzyme vor der Wasserstoffbrückenbildung mit den phenolischen OH-Gruppen der Tannine durch das Überangebot an Reaktionspartnern, mit denen die Gerbstoffe auf Wasserstoffbrückenbildung beruhende Komplexe bilden können bzw. durch das Abfangen oder Besetzen dieser Bindungsmöglichkeiten der Gerbstoffe (SCHNEIDER und HALLIER 1970).

Doch vermag auch PVP die Hemmwirkung der Gerbstoffe nicht gänzlich zu unterbinden oder rückgängig zu machen. Aus diesem Grund sind auch die Daten der Tabelle 4-8 - insbesondere beim Vergleich der Mutanten-Daten mit den Normalen-Daten - von relativer Bedeutung. Als in-vitro-Daten, die in wässrigen Extrakten aus aufgeschlossenem Zellmaterial

gemessen wurden, liegen sie sicherlich in der Regel niedriger als unter in-vivo Bedingungen. Dies gilt insbesondere für die Umsätze von Enzym-Rekationen, wie sie die Tabellen 4-6 wiedergeben.
Tabelle 4 zeigt die Umsatzraten
a) des Enzympaares Phosphoglycerat-Kinase / NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und
b) der Phosphoribulokinase, jeweils in $\mu mol \times (mg\ TG)^{-1} \times h^{-1}$.

Die Enzymaktivitäten wurden in Extrakten aus Blattsegmenten mit normalen bzw. mutierten Chloroplasten gemessen.

Die Daten, welche jeweils aus 2-10 Versuchen stammen, zeigen bei den Mutanten ausnahmslos Umsätze, welche zumindest in der Größenordnung des Umsatzes in Extrakten aus normalem Gewebe (vgl. PETERKOFSKY und RACKER 1961) liegen. (Bezgl. Raten photosynthetischer CO_2-Fixierung vgl. HEBER und TYSZKIEWICZ 1962, WALKER 1965, GIBBS et al. 1967).

Meist sind die Raten der Mutanten sogar deutlich höher. Dies ist darauf zurückzuführen, daß ihr Gewebe weniger phenolische Hemmstoffe enthält als das gut ernährte Blattgewebe mit normalen Chloroplasten. Wie entsprechende Versuche zeigten (HALLIER et al. 1968, SCHNEIDER und HALLIER 1970), bedingt dieser auf den Ernährungszustand zurückzuführende Unterschied im Gerbstoffgehalt - wie oben bereits erläutert - entsprechende Differenzen bei allen in-vitro-Versuchen mit Blattextrakten aus normalen und mutierten Segmenten - bei ersteren läßt sich ein erheblicher Verlust an Enzymaktivität

Tabelle 4: Umsätze Photosynthese-spezifischer Enzymreaktionen in Extrakten von gefriergetrocknetem Blattgewebe mit mutierten bzw. mit unmutierten Chloroplasten in $\mu mol \times (mg\ TG)^{-1} \times h^{-1}$:
a) NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.13) / Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3)
b) Ribose-5-phosphat-Isomerase (EC 5.3.1.6) / Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19)
Die graphische Darstellung der Tabelle 4 zeigt die Umsätze der Mutanten bezogen auf den Umsatz der Normalen.

Tabelle 4

Umsätze von Enzym-Reaktionen in Extrakten von Blattgeweben mit mutierten bzw. unmutierten (Wildtyp) Chloroplasten in $\mu mol \times (mg\ TG)^{-1} \times h^{-1}$

	NADP-abh. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase/ Phosphoglycerat-Kinase (EC 1.2.1.13/2.7.2.3)	Ribose-5-phosph.-Isomerase/Phospho-ribulokinase (EC 5.3.1.6/2.7.1.19)
I α	0,29	5,08
I β	0,62	6,20
I γ	0,48	7,64
I δ	1,09	2,39
I ε	0,34	4,88
I ζ	0,53	3,77
I η	0,29	3,43
I θ	0,89	5,78
I μ	0,26	8,05
I ν	0,20	4,95
I ξ	0,58	8,27
I ρ	nicht gemess.	nicht gemess.
I σ	0,96	8,17
II α	1,44	1,77
II β	0,19	4,79
II γ	0,40	0,99
II δ	0,23	2,72
II ε	0,35	4,50
II ζ	nicht gemess.	nicht gemess.
II η	0,77	nicht gemess.
II θ	nicht gemess.	nicht gemess.
II κ	0,28	3,47
IIIα	0,46	4,63
IIIβ	nicht gemess.	nicht gemess.
IV α	0,58	4,61
IV β	0,39	4,26
V α	0,48	6,13
V δ	0,34	2,37
Normale	0,23	3,63

selbst durch PVP-Zugabe nicht verhindern.

Im Testansatz a) wurde über die NADPH-Oxidation die Reduktion von Phosphoglycerat mit ATP und NADPH gemessen;

im Testansatz b) wurde die Aktivität der Phosphoribulokinase durch Messung des Umsatzes der Reaktionskette von Ribose-5-phosphat über Ribulose-5-phosphat zum Ribulose-1,5-bisphosphat bestimmt. Hierbei diente das bei der Phosphorylierungsreaktion von Ribulose-5-phosphat zum Ribulose-1,5-bisphosphat entstehende ADP, das sich im Pyruvatkinase / Lactatdehydrogenase-System (EC 2.7.1.40 / EC 1.1.1.27) spektralphotometrisch über die damit gekoppelte NADH-Oxidation leicht messen ließ, als indirektes Maß für den Substratumsatz.

Außer dem ATP-Verbrauch ließ sich bei letzterer Reaktion auch die Identifizierung des Endproduktes Ribulose-1,5-bisphosphat als spezifisches Kriterium für den Ablauf des angenommenen Umsatzes verwenden (HALLIER et al. 1968).

Die Daten der Tabelle 4 zeigen, daß die Mutanten über Enzymaktivitäten der beiden Photosynthese-spezifischen Enzyme NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und Phosphoribulokinase verfügen (vgl. PETERKOFSKY und RACKER 1961), die meist mindestens in der Höhe der Umsatzraten der Normalen liegen. Das bedeutet, daß - von einigen wenigen fraglichen Daten abgesehen - das Vermögen zur enzymatischen Reduktion von Phosphoglycerat und zur Phosphorylierung von Ribulose-5-phosphat zu Ribulose-1,5-bisphosphat wahrscheinlich bei den meisten Mutanten als die Photosynthese limitierende Schritte auszuschließen sind.

Das dritte der für die Photosynthese spezifischen Enzyme, die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase ist einmal bei Angebot von $^{14}CO_2$ im Testsystem von PON (1960) über das anfallende markierte Reaktionsprodukt Phosphoglycerat nachzuweisen (HALLIER et al. 1968).

Daneben gibt es die Möglichkeit, die Aktivität dieses Enzyms enzymatisch zu messen (LILLEY und WALKER 1974).

Graphische Darstellung zu Tabelle 4

Umsätze Photosynthese-spezifischer Enzyme in µmol × (mg TG)$^{-1}$ × h^{-1}

	NADP-abhängige GAPDH/PGK		Ri-5-P-Isomerase/Phosphoribulokinase	
	Umsatz	bezogen auf die Normale	Umsatz	bezog. auf die Normale
I α	0,29		5,08	
I β	0,62		6,20	
I γ	0,48		7,64	
I δ	1,09		2,39	
I ε	0,34		4,88	
I ζ	0,53		3,77	
I η	0,29		3,43	
I θ	0,89		5,78	
I µ	0,26		8,05	
I ν	0,20		4,95	
I ξ	0,58		8,27	
I ρ	nicht gemessen		nicht gemessen	
I σ	0,96		8,17	
II α	1,44		1,77	
II β	0,19		4,79	
II γ	0,40		0,99	
II δ	0,23		2,72	
II ε	0,35		4,50	
II ζ	nicht gemessen		nicht gemessen	
II η	0,77		nicht gemessen	
II θ	nicht gemessen		nicht gemessen	
II κ	0,28		3,47	
IIIα	0,46		4,63	
IIIβ	nicht gemessen		nicht gemessen	
IV α	0,58		4,61	
IV β	0,39		4,26	
V α	0,48		6,13	
V δ	0,34		2,37	
Norm.	0,23		3,63	

Die Ergebnisse beider Nachweismethoden zeigt Tabelle 5. Betrachtet man nur die Daten zur Kinetik der ^{14}C-Markierung säurestabiler Produkte im PON'schen Testsystem, so erweist sich diese Methode allein als nicht ausreichend bei den speziellen Verhältnissen der hier untersuchten Mutanten, um eine sichere Aussage machen zu können: im Gegensatz zu den recht einheitlichen Umsatzraten der Tabelle 4 von den beiden zuerst untersuchten Photosynthese-spezifischen Enzymen sind die ^{14}C-Daten der Tabelle 5 sowohl in den Absolutwerten wie auch in den Kinetiken, welche sie widerspiegeln, sehr uneinheitlich.

Teilweise sind die niedrigen Raten wohl Ausdruck eines offenbar trägen Ablaufes der geringen Photosynthese, derer die Mutanten z.T. noch fähig sind. Außerdem ist bei den verschiedenen Mutanten auch mit sehr unterschiedlich starker Hemmung enzymatisch gesteuerter Reaktionen zu rechnen, bedingt durch den bereits erwähnten, innerhalb des Mutanten-Sortimentes stark variierenden Gerbstoffanteil des Blattgewebes. Dies ist wohl auch der Hauptgrund für die niedrigen Fixierungsraten der Normalen im Vergleich zu den meisten Mutanten.

All dies führt zu starken Differenzen in der $^{14}CO_2$-Fixierungsleistung bei intaktem Blattgewebe, besonders aber im PON'schen Extrakt-Test auf RuBP-Carboxylase-Aktivität. Wahrscheinlich muß man wohl sogar davon ausgehen, daß der PON'sche Test bei so stark Gerbstoff-haltigen Objekten wie Oenothera ungeeignet ist.

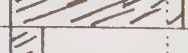
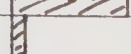
Tabelle 5: Umsatz des Photosynthese-spezifischen Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (EC 4.1.1.39) in Extrakten von gefriergetrocknetem Blattgewebe mit mutierten bzw. mit unmutierten Chloroplasten

a) im Test-System nach PON (1960): Markierung säurestabiler Produkte durch ^{14}C nach Inkubation mit $NaH^{14}CO_3$ in cpm/t

b) im enzymatischen Test nach LILLEY und WALKER (1974) in µmol CO_2-Fixierung $\times$ (mg TG)$^{-1} \times h^{-1}$ sowie in Relation zur Normalen.

abelle 5

Aktivität der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (EC 4.1.1.39)

	a) im Test-Sytsem nach PON in 0,025ml-Proben, Entnahme nach 30	60	120	240	480 sec.	b) im LILLEY-WALKER-Test in µmol CO_2 × (mg TG)$^{-1}$ × h^{-1}	Relation zur Normalen
I α	292	704	1351	2794	5967 cpm	0,35	
I β	1432	3200	5494	10393	20151	0,47	
I γ	118	479	892	1500	2794	nicht	gemessen
I δ	2720	4696	10350	15900	31724	0,39	
I ε	nicht gemessen					nicht	gemessen
I ζ	-	1102	2531	5100	10529	0,04	
I η	1271	5046	10068	20460	43484	0,64	
I θ	361	487	1397	3750	6600	nicht	gemessen
I μ	-	974	1778	3900	-	0,34	
I ν	-	224	462	670	1528	0,0	
I ξ	5759	11438	24211	53906	121654	nicht	gemessen
I ρ	nicht gemessen					nicht	gemessen
I σ	-	291	563	1106	2229	0,0	
II α	9142	12636	18448	30422	48902	0,15	
II β	178	324	676	1200	2530	0,44	
II γ	10462	17626	37780	63800	124480	0,63	
II δ	438	993	1335	2543	4642	0,48	
II ε	1621	4100	8467	16444	31338	0,03	
II ζ	2791	7044	12088	25433	52376	0,25	
II η	10687	15866	42682	66300	173300	0,58	
II θ	6344	13642	26834	54720	105208	0,02	
II κ	1490	1564	2686	3600	9062	0,57	
III α	2065	3720	-	16300	45913	0,10	
III β	880	1899	3620	7132	15124	0,63	
IV α	251	556	1721	4500	9269	0,37	
IV β	662	1848	3434	6178	11015	0,04	
V α	-	239	488	1500	-	0,03	
V δ	3537	10953	17920	40543	70600	0,74	
Norm.	371	554	1296	2020	3827	0,51	

Erschwert wird die Beurteilung der Test-Ergebnisse zusätzlich dadurch, daß ein Bezug auf den Wildtyp praktisch nicht möglich ist: bei der Normalen ist die RuBP-Carboxylase-Aktivität durch die hier besonders reichlich auftretenden Gerbstoffe trotz PVP-Einsatzes so stark gehemmt, daß sich keine Standardwerte ergeben - die Leistung der Normalen wird von den meisten Mutanten übertroffen; trotzdem darf daraus allein der Schluß auf ausreichende RuBP-Carboxylase-Aktivität der Mutanten noch nicht gezogen werden.

Die Hinzunahme des enzymatischen LILLEY-WALKER Tests auf RuBP-Carboxylase-Aktivität erlaubte etwas bessere Aussagen. Die bis auf wenige Ausnahmen bei einem Umsatz von ca. 0,2 bis 0,6 µmol $CO_2 \times (mg\ TG)^{-1} \times h^{-1}$ liegenden Raten ergeben ein klareres Bild von der Carboxylase-Aktivität der Mutanten. Bei den meisten von ihnen kann man auf Grund dieser kombinierten Ergebnisse das Vorliegen dieses RuBP carboxylierenden Enzyms in nicht limitierender Menge annehmen.

Interessant ist jedoch eine Mutantengruppe, deren Umsatzrate im Bereich von ca. 0,1 µmol und damit deutlich unterhalb des durchschnittlichen Aktivitäts-Niveaus liegt.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen hierunter wieder diejenigen Mutanten, bei denen sowohl niedrige $^{14}CO_2$-Fixierungsraten wie Ribose-5-phosphat-Umsatzraten auf einen möglichen Defekt bzw. Mangel oder Nicht-Vorhandensein des fraglichen Enzyms hindeuten könnten. Es sind dies die Mutanten Iγ, Iε, Vα und möglicherweise IVß sowie Iζ.

Bei diesen fünf Mutanten liegt der Verdacht auf einen Defekt im Bereich der RuBP-Carboxylase sehr nahe. Je nachdem, welches Gewicht man den ^{14}C-Einbauraten beimisst, gilt dies aber auch für die Mutanten IIε, IIθ und IIIα.

B. Untersuchung des Elektronentransportes

Die bisher dargestellten Untersuchungen zielten auf das CO_2-Fixierungsvermögen der Mutanten und damit auf den Calvin-Zyklus, den Dunkelteil der Photosynthese, ab. Aus ihren Ergebnissen resultierte für die meisten Mutanten zunächst ein weites Spektrum auszuschließender Defekt-

Tabelle 6

PGS - Gehalt bzw. ATP - Gehalt v. Blättern

im Dunkeln bzw. nach 20 sec. Belichtung in 10^{-3} µmol × (mg TG)$^{-1}$

	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht
I α	0,75	0,48	0,49	0,81
I β	0,73	0,39	0,72	0,81
I γ	2,40	0,82	1,74	1,91
I δ	0,84	1,11	0,64	0,95
I ε	1,06	0,74	0,68	0,81
I ζ	nicht gemessen		nicht gemessen	
I η	0,27	0,20	0,68	0,96
I θ	0,39	0,38	0,68	0,89
I µ	nicht gemessen		nicht gemessen	
I ν	0,57	0,53	nicht gemessen	
I ξ	0,43	0,31	nicht gemessen	
I ρ	nicht gemessen		nicht gemessen	
I σ	nicht gemessen		0,46	1,07
II α	1,07	0,43	0,59	0,70
II β	0,29	0,17	0,66	0,81
II γ	2,30	1,17	1,04	1,49
II δ	0,80	0,35	nicht gemessen	
II ε	0,61	0,26	0,71	0,85
II ζ	nicht gemessen		nicht gemessen	
II η	0,38	0,28	nicht gemessen	
II θ	nicht gemessen		nicht gemessen	
II ι	0,89	0,68	0,64	0,76
III α	nicht gemessen		0,35	0,76
III β	nicht gemessen		nicht gemessen	
IV α	nicht gemessen		nicht gemessen	
IV β	nicht gemessen		0,72	0,83
V α	0,28	0,04	0,43	0,82
V δ	0,65	0,56	0,64	0,74
Normale	3,11	2,06	0,78	1,03

die Blattsegmente mit mutierten Chloroplasten - unterschiedlich stark - befanden. Sicherlich spielten hierbei aber auch zusätzliche Material-Differenzen eine Rolle, wie nicht nur die Messungen an normalem Oenothera-Gewebe, sondern auch Meßergebnisse von Spinatblättern deutlich zeigten.

Darüber hinaus deuteten auch diese Schwankungen im Dunkel-Licht-Wechsel bei den meisten Mutanten wieder deutlich darauf hin, daß das Enzymsystem zur PGS-Reduktion bei den untersuchten mutierten Chloroplasten prinzipiell funktionsfähig ist - eine Ergänzung zu den Daten der Tabelle 4 - und daß im Licht Cofaktoren zur Reduktion der PGS angeliefert werden.

Aus dem Anstieg des ATP-Pegels innerhalb von 20 sec. Belichtung läßt sich in etwa die Mindestrate der ATP-Synthese, derer die Mutanten fähig sind, abschätzen. Sie betrug meist zwischen 5 und 20 µmol × (mg Chlorophyll)$^{-1}$ × h^{-1}. Da jedoch gleichzeitig auch für die PGS-Reduktion ATP verbraucht wird - ablesbar am Absinken des PGS-Pegels - ist die effektive Rate der ATP-Synthese sicherlich höher anzusetzen. Sie liegt damit um ein mehr- bis vielfaches höher als die festgestellte CO_2-Fixierung (außer bei den beiden Mutanten IIκ und IVβ, bei denen ATP-Synthese und CO_2-Fixierung etwa in gleicher Höhe liegen), was bedeutet, daß die Bereitstellung von ATP im Licht durch die Elektronentransportkette der Chloroplasten bei den meisten Mutanten nicht der limitierende Schritt sein kann, welcher die Photosynthese-Leistung entscheidend beeinträchtigt.

Daß auch diese hier besprochenen Pegel-Messungen nur eine zusätzliche, für sich allein jedoch nicht beweiskräftige Teilinformation bringen, zeigen besonders deutlich die Daten der Normalen, deren ATP-Synthese von unter 20 µmol deutlich unter der CO_2-Fixierungsleistung bleibt. Auch hier gilt wieder - worauf schon im Zusammenhang mit den Tabellen 4 und 5 hingewiesen wurde - daß die Beeinträchtigung von Enzym-Reaktionen durch Gerbstoffe den Daten der Normalen, welche aus enzymatischen in-vitro-Tests stammen, nur relative Bedeutung zukommen lassen.

6. NADPH-Pegel-Messungen

Mit der PGS-Reduktion direkt verknüpft ist nicht nur das Problem der ATP-Synthese, sondern auch die Frage nach der Bildung von NADPH und NADH, d.h. nach dem Vermögen der Mutanten zur Photoreduktion von Pyridinnucleotiden.

Der NADH-Spiegel der Blattzelle ist im Dunkeln sehr niedrig und nahe der Nachweisgrenze, die jeweiligen NADPH-Mengen liegen deutlich höher. Im Licht steigen die Spiegel der reduzierten Pyridinnucleotide analog dem ATP-Anstieg während der ersten 20-30 sec. rasch an, fallen dann aber ebenso und aus denselben Gründen wie der ATP-Spiegel mit Anlaufen der photosynthetischen CO_2-Fixierung ab (HEBER und SANTARIUS 1965).

Rascher Umsatz und geringer Umfang des NADP / NADPH-Pools der Chloroplasten machen die Erfassung der Pool-Schwankungen schwierig und die Ergebnisse ungenau. Diese Meßmethode wurde bei einer ersten Mutantengruppe angewandt, später aber wieder aufgegeben. Tabelle 7 zeigt eine Datenzusammenstellung der 4 Mutanten I_γ, I_δ, II_α und II_γ im Vergleich zur Normalen mit Messungen der NADPH-Pegel im Dunkeln und nach 20 sec. Belichtung in 10^{-5} µmol × $(mg\ TG)^{-1}$.

Exp.Nr.	Normale		I_γ mut		I_δ mut		II_α mut		II_γ mut	
	Dunkel	Licht	Du	Li	Du	Li	Du	Li	Du	Li
1	2,62	4,15	4,0	6,3	6,3	9,0	3,9	4,8	3,7	4,9
2	2,83	4,16	6,6	8,6	-	-	8,6	12,8	6,3	12,7
3	-	-	8,0	13,2	-	-	-	-	3,2	5,0

Tabelle 7: NADPH-Pegel im Dunkeln nach 20 sec. Belichtung in 10^{-5} µmol × $(mg\ TG)^{-1}$ in Blattgewebe mit normalen bzw. mit unmutierten Chloroplasten

Obwohl die Daten der Tabelle 7 deutlichen Anstieg der NADPH-Pegel im Licht - und zwar bei Blattmaterial mit mutierten Chloroplasten ebenso wie bei der Normalform - anzeigen, ergaben weitere Untersuchungen des Elektronentransportes, vor allem Fluoreszenz- und Lichtstreuungsmessungen, daß solche NADPH-Pegel-Messungen für eine prinzipielle Beurteilung der Energiekonservierung im Lichtteil der Photosynthese offensichtlich nicht aussagekräftig genug sind.

7. Photoreduktion von 2,6-Dichlorophenolindophenol und Methylviologen durch isolierte Chloroplasten

Die Wirkungen der in Oenotheren so reichlich vorhandenen Gerbstoffe auf Biomembranen vor allem isolierter Chloroplasten und -fragmente sind noch schwerer wiegend als ihre Wirkung auf lösliche Enzyme. Ihnen ist außerdem noch schwieriger zu begegnen als im Falle der Enzymtests (SCHNEIDER und HALLIER 1970). Diese Tatsache erschwert in besonderem Maße die Untersuchung von Reaktionen der Elektronentransportkette von Oenothera-Chloroplasten und -fragmenten.

Dennoch gelang bei einer Reihe von Mutanten die Messung der lichtabhängigen DCPIP-Reduktion sowie der Reduktion von Methylviologen in Blattextrakten.

Auch hier zeigten die gemessenen Reaktionsraten wieder, daß gerade die Normalform in ihrer Leistung deutlich unter ihren in vivo anzusetzenden Elektronentransportraten liegt.

Die Ursache hierfür ist der Gerbstoff-bedingte Aktivitätsverlust, welcher während der Isolierung eintritt und der - zumal er die besonders gerbstoffreiche Normalform stärker betrifft - einen Bezug der Mutanten-Raten auf die Leistung der Normalen praktisch nicht zuläßt.

Auf die Bedeutung der DCPIP- und MV-Reduktionsraten gerade für die in Tabelle 8 zusammengestellten Mutanten Iα, IVβ und Vα wird später zurückzukommen sein.

	Normale	Iσ	IVβ	Vα
DCPIP-Reduktion	70,1	24,9	9,3	30,3
MV-Reduktion	15,3	12,8	0	35,5
MV-Red. nach DPC-Zugabe	-	23,9	29,9	22,8

Tabelle 8: Reduktion von 2,6-Dichlorophenolindophenol und Methylviologen in Extrakten aus Blättern mit mutierten bzw. mit normalen Chloroplasten im Licht in $\mu mol \times (mg\ Chlorophyll)^{-1} \times h^{-1}$.

Die Reduktion der beiden Elektronenacceptoren DCPIP und MV hat insofern Bedeutung für eine Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette, als die Reduktion von DCPIP mit großer Wahrscheinlichkeit vom Photosystem II durchgeführt wird, während Methylviologen auf Grund seines niedrigen Redox-Potentials nur durch Photosystem I reduziert werden kann (WITT et al. 1966a, AVRON 1975, GOLBECK et al. 1977).

Bei der (lichtabhängigen) Reduktion von Methylviologen in der Sauerstoffelektrode ist die Abnahme der O_2-Konzentration im Assay ein Maß für den Transport der aus der Wasserspaltung stammenden Elektronen via Photosystem II und Photosystem I zum MV bzw. für die H_2O_2-Bildung aus dem vorhandenen Sauerstoff und den vom MV weitergeleiteten Elektronen. Überprüfen läßt sich dieses System durch Zugabe von 1,5-Diphenylcarbazid (vgl. Tabelle 8), das dann an Stelle des Wassers als Elektronen-Donor für Photosystem II dient (YAMASHITA und BUTLER 1969).

8. Differenzspektren

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung des Elektronentransportes bieten Licht-Dunkel-Differenz-Spektren intakter Blätter (LEVINE 1969): auf Belichtung reagieren diese mit Änderungen ihrer Lichtabsorption (WITT und MORAW 1959,

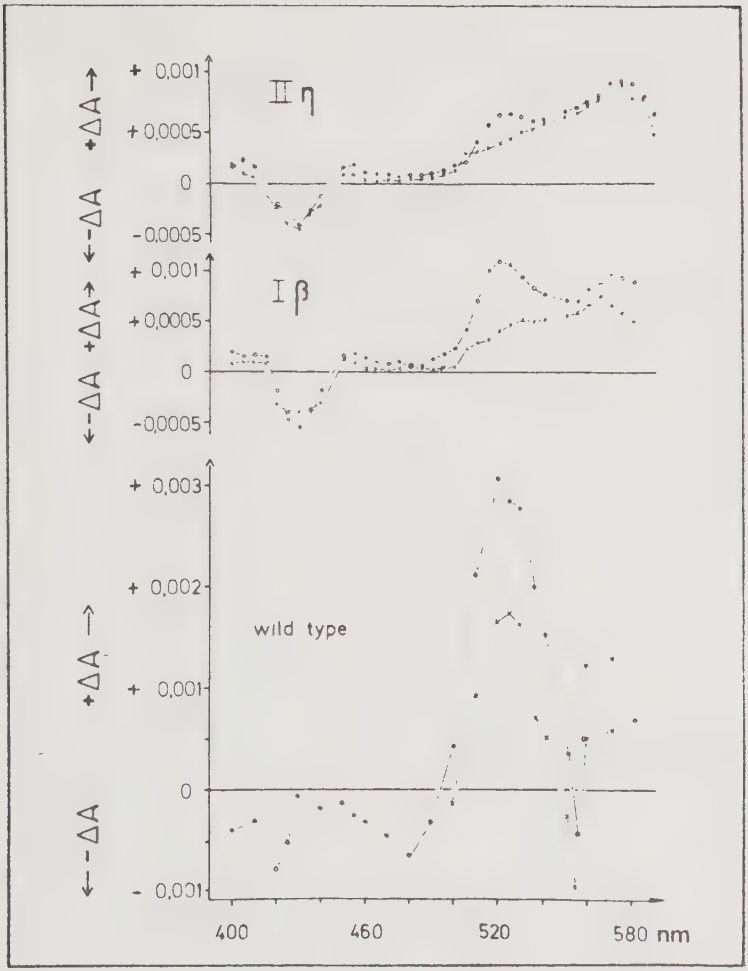


Abb. 3a
Differenzspektren des Wildtyps sowie der Mutanten IIη und Iβ.
Belichtung: 10 sec. Breitbandrotlicht (35 Watt $\cdot m^{-2}$)

o = ΔA-Differenzen zwischen Dunkel und 1 sec. Licht
+ = ΔA-Differenzen zwischen Licht und 2,5 sec. Dunkel

FORK und de KOUCHKOVSKY 1966, FORK et al. 1967). Aus diesen ΔA-Änderungen im Spektralbereich zwischen 400 und 580 nm ergeben sich charakteristische Spektren.

Die Abbildungen 3a und 3b zeigen Licht-Dunkel-Differenz-Spektren von Blättern einiger Oenothera-Mutanten sowie vergleichsweise des Wildtyps.

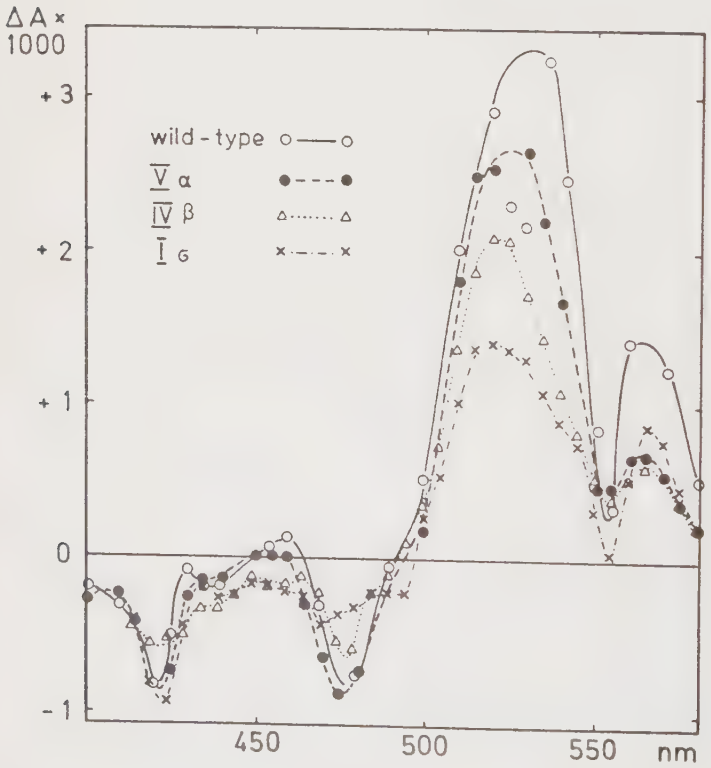


Abb. 3b

Differenzspektren des Wildtyps sowie der Mutanten Iσ, IVβ und Vα.

Belichtung: 10 sec. Breitbandrotlicht (35 Watt x m^{-2})

ΔA-Differenzen zwischen Dunkel und 1 sec. Licht

Diese Spektren wurden in Luft mit einem sehr empfindlichen Einstrahl-Spektralphotometer mit monochromatischem Meßlicht aufgenommen, als Anregungslicht diente sättigendes Breitband-Rotlicht (vgl. Methoden).

Während Untersuchungen der PGS- und der ATP-Pegel-Schwankungen im Dunkel-Licht-Wechsel wie auch NADPH-Pegel-Messungen nur Rückschlüsse auf das Funktionieren des Elektronentransportes insgesamt, DCPIP- und MV-Photoreduktion nur solche über das Funktionieren der Photosysteme zulassen, ergeben sich aus Differenzspektren, wie sie beispielsweise Abb.3 zeigt, eine Reihe von Informationen über das Funktionieren bestimmter Teilabschnitte oder Einzelglieder der Elektronentransportkette direkt bzw. im Vergleich zur Reaktion der Normalform.

a) Membranpotential-Signal

Auffällig ist zunächst als sehr schnelle Reaktion auf Belichtung eine starke Absorptionszunahme im Bereich von 500-550 nm, die ihr Maximum bei 518 nm erreicht. Ihr zuzuordnen ist das negative Band mit einem Minimum etwa bei 480 nm.
Beide Reaktionen werden interpretiert als Membranpotential-abhängige Absorptionsänderungen oder -verschiebungen ("electrochromic shift") in der Absorption der Lutein/Chlorophyll b-Komplexe (SCHMIDT et al. 1971, WITT 1976, SEWE und REICH 1977), welche die durch Belichtung bewirkte Errichtung eines Membranpotential-Unterschiedes durch die Thylakoidmembranen hindurch anzeigen. Zur Aufrechterhaltung dieses Membranpotentials bedarf es ständigen Elektronentransportes.

Bei den Mutanten mit blockiertem Elektronentransportsystem wie z.B. Iβ oder IIη (Abb. 3a) tritt diese Absorptionsänderung mit Maximum bei 518 nm entweder nur deutlich abgeschwächt auf, oder sie erscheint nur als sehr kurze, schnelle Reaktion - d.h., das Membranpotential tritt wegen ungenügenden Elektronenflusses nur kurzzeitig auf und bricht sofort wieder zusammen (z.B. Abb. 4: Iβ) - oder aber

sie fehlt völlig, d.h. Elektronentransport, der ein Membranpotential aufbaut, findet überhaupt nicht statt.

Bei einer sehr schnellen, kurzfristigen Reaktion, wie sie die Mutanten Iß und IIη in Abb.3a zeigen, äußert sich das Fehlen eines kontinuierlichen Elektronenflusses darin, daß das Schreibersignal nur eine schnelle kurze Absorptionsänderung anzeigt, d.h. das kurzzeitig aufgebaute Potential bricht unmittelbar wieder zusammen. Dies ist die wahrscheinlichere Interpretation des schnellen Signals in diesem Spektralbereich - denkbar wäre allerdings auch die Möglichkeit, daß zwar ein kontinuierlicher Elektronenfluß existiert, daß jedoch eine hohe Membranpermeabilität die Aufrechterhaltung des Membranpotentials verhindert.

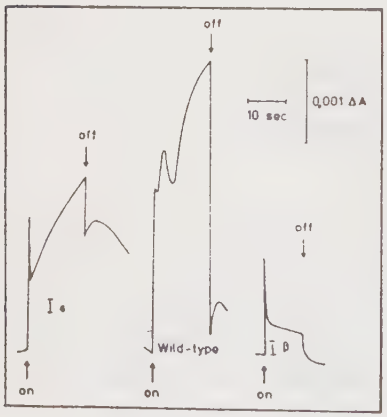


Abb.4
Licht-abhängige Absorptionsänderungen von Blättern des Wildtyps sowie der Mutanten Iß und IIη bei 515 nm. Belichtung mit sättigendem Breitband-Rotlicht (vgl. auch Abb.3a + 3b).

Typische Schreibersignale des Wildtyps sowie von Mutanten mit defektem (z.B. Iß) bzw. mit intaktem Elektronentransport (z.B. Iσ) zeigt Abb.4: Die Absorptionsänderungen bei 515 nm ergeben beim Wildtyp ein mehrphasiges Potential-Aufbau-Signal, dem das einer Mutanten mit intaktem Elektronentransport wie Iσ sehr ähnlich ist; demgegenüber führt ein defekter Elektronentransport wie bei der Mutanten Iß

zum erwähnten kurzen, den Potential-Zusammenbruch widerspiegelnden Signal: Bei normalem Elektronentransport, wie wir ihn beim Wildtyp - aber z.B. auch bei der Mutanten Iσ - finden, schließt sich der ersten, schnellen Potential-Aufbau-Reaktion ein weiteres, stärkeres Signal an, welches wahrscheinlich Ausbau und Stabilisierung des Potentials wiedergibt - möglicherweise aber auch schon der Lichtstreuung zuzurechnen ist, deren Maximum bei 538 nm liegt. Diese zweite Signalphase fehlt bei ausbleibendem Elektronenfluß, wie das Beispiel der Mutanten Iβ zeigt.

Abb. 4 zeigt auch deutlich, daß Verdunkelung bei Normalen wie auch bei Mutanten mit intaktem Elektronentransport und normalen Permeabilitätseigenschaften der Thylakoide nicht nur zu sofortigem Zusammenbruch des Membranpotentials, d.h. des 518nm (bzw. 515nm)-Signals führt, sondern gleich darauf erfolgt nochmals eine langsame, kurzfristige Absorptionszunahme. Diesen letzteren Effekt zeigen Mutanten mit defektem Elektronentransport nicht (vgl. Iβ in Abb.4); er wird dem vorübergehend aufgebauten Diffusionspotential zugeschrieben, das kurzzeitig im Zuge des Ausgleiches des zusammengebrochenen lichtabhängigen Protonengradienten durch eine von diesem Zusammenbruch ausgelöste Ionendiffusion aufgebaut wird (HALLIER et al. 1978).

Bei der Normalen wird das Membranpotential bzw. der Potential-Unterschied während der gesamten Belichtung, d.h. unter ständigem Elektronen-Nachschub, aufrechterhalten. Die Absorptionsabnahme mit Minimum bei 480nm, welche das 518nm-Signal bei der Normalen und bei Mutanten mit ungestörtem Elektronenfluß stets begleitet (Abb.3b), fehlt bei Mutanten mit defektem Elektronentransport.

Untersuchungen der Absorptionssignale von Blättern bei 518nm - vor allem auch unter Verwendung des Photosystem II blockierenden Inhibitors DCMU - haben gezeigt, daß sich - belichtet man die intakten Blätter mit beide Photosysteme anregendem Breitband-Rotlicht - das dabei ergebende 518nm-Membranpotential-Signal aus den Reaktionen beider Photosysteme zusammensetzt: blockiert man Photosystem II mit DCMU, so

bleibt vom Signal des Wildtyps,wie es Abb.4 zeigt, nur der - wenn auch verminderte - schnelle erste Anstieg der Absorption, während die normalerweise folgende starke Absorptionszunahme zum "steady state" fast völlig fehlt. Dieses Rest-Signal gibt den Anteil des Photosystems I am 518nm-Signal wieder, während das Photosystem II für den durch DCMU unterdrückten Teil dieser Absorptionsänderung,d.h. für einen kleinen Teil des ersten schnellen Anstiegs und vor allem für den folgenden Anstieg zum "steady state", d.h. die Konsolidierung des Membranpotentials verantwortlich ist (FORK et al. 1967, FORK und HEBER 1968).
Diese Absorptionsänderungen bei 518nm, wie sie sich hier bei Oenothera ergeben, sind typisch für diejenigen, welche alle Chlorophyll b enthaltenden grünen Pflanzen zeigen (WITT und MORAW 1959, FORK und de KOUCHKOVSKY 1966, FORK et al. 1967); somit liefern die 518nm-Signale der Licht-abhängigen Absorptionsänderungen (vgl.Tab.10) wichtige weitere Informationen über das Funktionieren der beiden Photosysteme, der Einsatz von DCMU ermöglicht eine zusätzliche Differenzierung und Absicherung dieser Befunde.

b) Cytochrom f

Ein weiterer Bereich des Differenzspektrums, der sich bei einigen der Mutanten als aufschlußreich für die Beurteilung des Elektronentransportes erweist, ist die deutliche Absorptionsabnahme, welche diese mit einem Minimum bei 430nm aufweisen und die mit ihrer Halbbandbreite von 25nm als fast trogartiger Einbruch erscheint (Abb.3a: Iβ + IIη). Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Absorptionsminimum um P_{700}-Photooxidation; da eine entsprechende α-Bande fehlt, kann es sich um keine Cytochrom-Oxidation handeln. Ganz offensichtlich ist dieses Absorptionsminimum anderen Charakters und auch von der Position her nicht zu verwechseln mit der deutlichen, negativen γ- oder Soret-Bande des Cytochroms f mit Minimum bei 420nm, die sich bei der Normalen, aber auch bei Mutanten wie denen der Abb.3b (I_σ, IVβ, Vα) findet.

Cytochrom f hat besondere Bedeutung innerhalb der Elektronentransportkette, da es nach dem gängigen Z-Schema (HILL und BENDALL 1960, TREBST 1974, 1978) zwischen den Photosystemen II und I einzuordnen ist, wo es als Redox-Carrier dient, der von Photosystem I oxidiert und von Photosystem II reduziert wird (DUYSENS und AMESZ 1962, OLSON und SMILLIE 1963, FORK und URBACH 1965, AVRON und CHANCE 1966, AMESZ und FORK 1967).

Im Differenzspektrum zeigen stark ausgeprägte Absorptionsminima bei 420nm und 555nm (bzw. 554nm) lichtabhängige Photooxidation von Cytochrom f an. Diese deutlichen Hinweise auf Cytochrom f finden sich bei den Normalen wie auch bei den meisten grünen Mutanten, wie sie in Abb. 3b die Mutanten I_{σ}, IV_{β} und V_{α} charakteristisch zeigen, sie fehlen interessanterweise bei einer bestimmten Mutantengruppe (I_{β}, II_{η},: vgl. Abb.3a). Diese Befunde werden später bei der gruppenweisen Beurteilung der Mutanten wieder aufgegriffen werden.

c) Cytochrom b

Je nach Art der Mutanten bzw. der bei einem Teil von ihnen vorliegenden Defekte im Elektronentransport geben Differenzspektren Informationen über das Funktionieren weiterer Einzelglieder der Elektronentransportkette der Photosynthese oder auch der Atmungskette.

Abb. 5a+b zeigt Beispiele unterschiedlicher Differenzspektren von Mutanten. Darunter sind zwei Mutanten (II_{δ}, II_{κ}), bei denen - begünstigt durch nur schwach sichtbar werdende Membranpotential-Signale zwischen 500nm und 550nm - deutliche Cytochrom b-Reduktion zu erkennen ist: die Spektren aus den Dunkel-Licht-Differenzen nach 1 sec. Belichtung lassen bei beiden Mutanten die Absorptionsmaxima der reduzierten Form von Cytochrom b mit ihren "Peaks" bei 563nm, 532nm und 429nm deutlich hervortreten.

Noch etwas deutlicher zeigen sich diese α-, β- und γ-(Soret-)Banden im sichtbaren Bereich, wenn - was bei einigen Mutanten wie z.B. bei der hier nicht gezeigten Mutante II_{β}

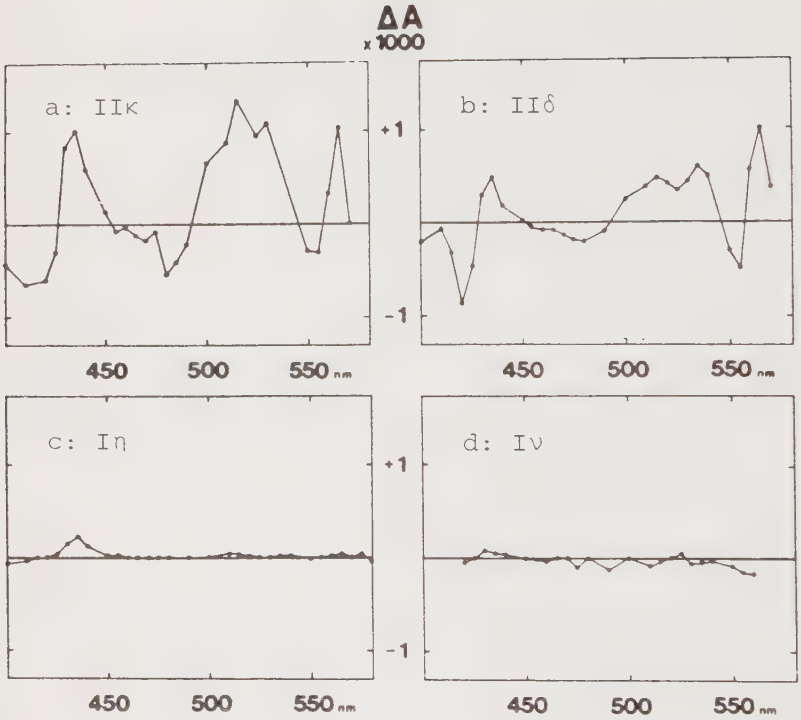


Abb.5: Differenzspektren der Mutanten IIκ, IIδ, Iη, Iν.
ΔA-Differenzen zwischen Dunkel und 1 sec. Licht
Belichtung: s. Abb.3a

der Fall ist - die Cytochrom f-Oxidation ausbleibt und somit im Bereich um 420nm bzw. 554nm nicht interferiert.

Die leichte Verschiebung der Maxima um 3-5nm in längerwellige Bereiche beruht einmal darauf, daß es sich hierbei um in-vivo-Messungen an ganzen Blättern handelt, die natürlich ein sehr komplexes Reaktionsbild ergeben im Gegensatz zu den rein isolierten Verbindungen wie die, an denen die obigen Maxima gemessen wurden.

Ein weiterer Grund für die Verschiebung ist eine gewisse Schwankungsbreite und damit Ungenauigkeit der hier wiedergegebenen Spektren durch die 5nm-Abstände der Einzelmessungen, aus denen sie sich zusammensetzen.

Noch stärkere Reduktion der auf Elektronentransport hinweisenden Signale zeigen z.B. die beiden Mutanten I_η (Abb.5c) - ihr Differenzspektrum läßt nur noch, wenn auch schwache, Cytochrom b-Reduktion erkennen - und I_ν (Abb.5d), die auf Belichtung hin praktisch keine Elektronentransport-Reaktionen erkennen läßt.

Bei der Beurteilung dieser vier Mutanten ist wiederum die Pigmentierung interessant (Tab.1): während die beiden Mutanten II_δ und II_κ über 60-70% des Chlorophyllgehaltes der Normalen verfügen, gehören die beiden Mutanten I_η und I_ν mit 3-5% des normalen Chlorophyllgehaltes zu den extrem Chlorophyll-armen Mutanten.

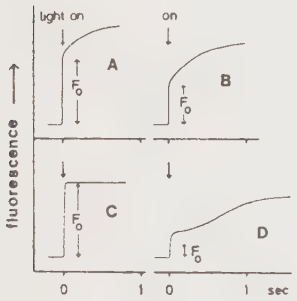
Eine Zusammenstellung der Informationen, welche sich aus den Differenz-Spektren der Mutanten ergeben, folgt zusammen mit den Daten aus dem jeweiligen Lichtstreuungs-Verhalten in Tabelle 10 (s. 10. Lichtstreuung). Diese Informationen gehen in die Einzelbeurteilungen der Mutanten ein.

9. Fluoreszenz

Bei dem bereits erwähnten, heute allgemein zugrunde gelegten Z-Schema des photosynthetischen Elektronentransportes sind zwei Photosysteme in Serie geschaltet. Eines - Photosystem II - ist direkt mit der Wasserspaltung verknüpft, das andere - Photosystem I - führt zur NADP-Reduktion (WITT 1971, TREBST 1978).

Wesentlichen Aufschluß über Photosystem II und seine Funktionsfähigkeit in vivo liefert die hierfür als sehr empfindliches Kriterium dienende Chlorophyll-Fluoreszenz (DUYSENS 1952, BUTLER 1962, DUYSENS und SWEERS 1963, BUTLER und BISHOP 1963, BOARDMAN et al. 1966, GOVINDJEE und PAPAGEORGIOU 1971, PAPAGEORGIOU 1975).

Abb.6 zeigt dies deutlich an Hand der Fluoreszenz-Signale verschiedener Mutanten-Typen (A-C) im Vergleich zur Normalform (D) bei Belichtung mit Blaulicht relativ niedriger Intensität (13 W × m^{-2}):



A = Mutante Iß
B = Mutante IIη
C = Mutante IIγ
D = Normale

Abb.6

Chlorophyll-Fluoreszenz von Blättern während der ersten Sek. der Belichtung mit 13 W × m^{-2} Blaulicht.
Das jeweilige Verhältnis der schnellen (F_o) zur variablen Fluoreszenz ist ein wichtiges Signalcharakteristikum; die quantitativen Fluoreszenzunterschiede von Messung zu Messung beruhen auf unterschiedlichen Parametern der Meß-Geometrie und sind insignifikant.

Die Mutante IIγ (C) weist ein sogenanntes "Rechteck-Signal" auf, d.h. einen schnellen, einstufigen Fluoreszenzanstieg auf ein konstantes Niveau. Dieses Signal zeigt zuverlässig an, daß Photosystem II nicht funktioniert (DUYSENS und SWEERS 1963).

Normalerweise (vgl. D) kommt es bei Belichtung nach längerer Dunkelzeit zunächst zu einem sehr schnellen ersten Anstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz (WITT 1971), dem ein - im allgemeinen zweiphasiger - weiterer, langsamer Anstieg zu einem höheren, aber nicht auf Dauer beibehaltenen Fluoreszenzniveau folgt (KAUTSKY und HIRSCH 1935).

Dieser zweite Anstieg spiegelt - so nimmt man an - die Reduktion der Elektronenüberträger zwischen den Photosystemen durch Photosystem II wider (DUYSENS und SWEERS 1963, KOK und CHENIAE 1966, BUTLER 1966). De facto ist in diesem zweiten Fluoreszenzanstieg die mit Auffüllen der Elektronentransportkette zunehmende Reduktion des "Quenchers" Q zum reduzierten Zustand - in welchem Q die Fluoreszenz nicht mehr "löscht" - zu sehen (DUYSENS und SWEERS 1963): je weniger Elektronen der anlaufende Elektronentransport aufnimmt - wobei die Reduktion von Q als Anzeige für den Transport im Photosystem II dient - desto mehr Energie wird als Fluoreszenz abgegeben.

Dieser zweite Anstieg der Fluoreszenz, die "variable Fluoreszenz", verläuft bei der Normalform langsamer als bei Mutanten wie Iß und IIη, was darauf hindeutet, daß der Pool der reduzierbaren Elektronenüberträger zwischen den beiden Photosystemen bei den Mutanten kleiner und dementsprechend schneller durchreduziert ist und/oder es werden hier Unterschiede in der Anzahl von Photosystem II-Reaktionszentren ("traps", "trapping centers") sichtbar.

Die Höhe der schnellen Fluoreszenz F_o ist eine Funktion der Dunkelzeit zwischen den Belichtungen. Dies gilt allerdings nur für die Normalform sowie für Mutanten mit intaktem Photosystem II, nicht für Mutanten wie IIγ, deren Photosystem II offensichtlich nicht funktioniert (FORK und HEBER 1968, FORK et al. 1968, HALLIER 1968). Diese Abhängigkeit der schnellen Fluoreszenz F_o von der Länge der vorausgegangenen Dunkelphase gibt die Reoxidationsrate an, welcher der im Licht reduzierte Quencher Q im Dunkeln unterliegt.
Dies zeigt auch Abb. 7 für die Mutanten Iß und IIη, deren Reoxidationsraten von Q von derjenigen der (nicht gezeigten) Normalen nur quantitativ verschieden ist, während sie sich von dem Verhalten der Mutanten IIγ, einer Photosystem II-Mutante, qualitativ stark unterscheiden.

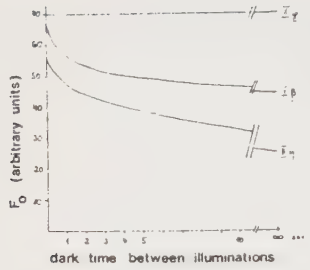


Abb.7
Die schnelle Fluoreszenz F_o (vgl. Abb.6) als eine Funktion der Dunkelzeiten zwischen den Belichtungen mit 13 $W \times m^{-2}$ Blaulicht, in relativen Einheiten.

Abb. 8 zeigt das bereits erwähnte Absinken der variablen Fluoreszenz vom erreichten Maximum auf ein niedrigeres Niveau wenig über F_o, den sogenannten "Kautsky-Effekt" (KAUTSKY und HIRSCH 1935) bei der Normalform von Oenothera. Dieser Effekt spiegelt die Beeinflussung der Energieverhältnisse im Bereich der Photosynthese durch einen Energie-abhängigen, mit der Photosynthese verknüpften Prozeß wider:

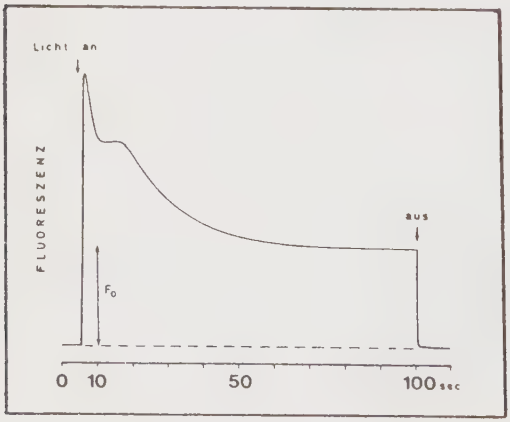


Abb.8
Langzeit-Chlorophyll-Fluoreszenz der Oenothera-Normalform bei 742nm in CO_2-freier Luft. Belichtung mit 13 $W \times m^{-2}$ Blaulicht.

er zeigt den vom Elektronentransport getriebenen Mg^{2+}-Transfer - und wahrscheinlich weitere Ionenflüsse - durch die Thylakoidmembranen an (KRAUSE 1973, BARBER et al. 1974, KRAUSE 1974). Ein Fehlen dieses Kautsky-Effektes deutet darauf hin, daß die Licht-abhängigen Ionen-Fluxe durch die Thylakoidmembranen hindurch sehr klein sind.

Die Informationen, welche das jeweilige Fluoreszenz-Verhalten der Mutanten liefert, sind in Tab. 9 zusammengestellt. Diese Daten gehen in die Einzelbeurteilungen der Mutanten ein.

Zusätzliche Information über das Funktionieren des Elektronentransportes bei den einzelnen Mutanten ergibt sich daraus, wie sie jeweils auf einen Wechsel der Gasphase während längerandauernder Fluoreszenzmessungen reagieren: während normalerweise Messung in einer N_2-Atmosphäre die variable Fluoreszenz im Vergleich zur Messung in O_2 drastisch erhöht - Grund: komplette Reduktion des Quenchers Q (DUYSENS und SWEERS 1963) und Hemmung des Elektronentransportes infolge Fehlens des Elektronenakzeptors O_2 - und Wechsel von N_2 auf O_2 die Fluoreszenz wieder auf das normale Niveau zurückführt (Abb. 9A), reagieren Mutanten mit defektem Elektronentransport je nach Art ihres Defektes nicht oder nur sehr schwach auf solchen Gaswechsel (vgl. Abb. 9B+C).

Dieses Reagieren der jeweiligen Mutanten ist davon abhängig, inwieweit der Elektronen-Transfer zum O_2 in der an beide Photosysteme gekoppelten Mehler-Reaktion (MEHLER 1951)

Tabelle 9: Fluoreszenz-Verhalten von Blättern bzw. Blattsegmenten der Mutanten und der Normale.
Anregung der Chlorophyll-Fluoreszenz mit Blaulicht bzw. kurzwelligem Rotlicht, Messung bei 684nm bzw. 742nm.
+ = Reaktion (unterschiedlicher Stärke) feststellbar
- = Reaktion nicht vorhanden bzw. nicht feststellbar

Tabelle 9

Informationen aus dem Fluoreszenz-Verhalten der Mutanten

	1. Schnelle Fluoreszenz		2. Langzeit-Fluoreszenz
	Rechteck-Signal	normal.Signal	(Kautsky-Effekt)
I α	+		schwach
I β		+	-
I γ	+		-
I δ	+		schwach
I ε	+		schwach
I ζ		+	schwach
I η		+	schwach
I θ		+	schwach
I μ		+	schwach
I ν		+	+
I ξ	+		-
I ρ	+ ?		+
I σ		+	+
II α		+	+
II β		+	-
II γ	+		schwach
II δ		+	schwach
II ε		+	-
II ζ	+		schwach
II η		+	-
II θ		+	-
II κ		+	+
IIIα	+ ?		+
IIIβ		+	-
IV α		+	-
IV β		+	+
V α		+	+
V δ		+	schwach

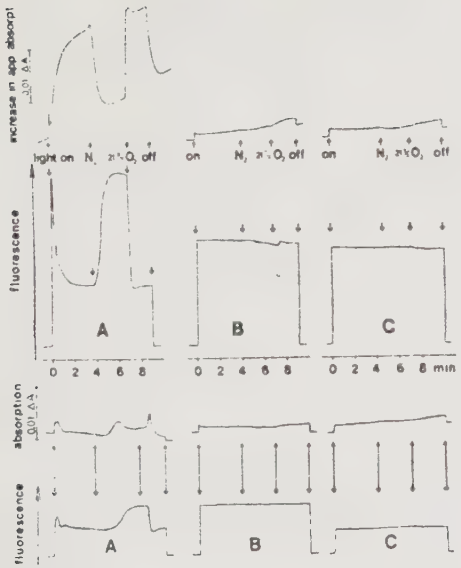


Abb.9
Gleichzeitige Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 742nm und der Lichtstreuung bei 538nm an ganzen Blättern von

Wildtyp = A
Mutante IIη = B
Mutante Iβ = C

in CO_2-freier Luft bzw. in N_2-Atmosphäre. Belichtung: 16,6W × m^{-2} (oben) bzw. 4 W × m^{-2} (unten) Breitband-Rotlicht
Gasflußrate: 40 l × h^{-1}.

Veränderte Lichtstreuung erscheint als Änderung der apparenten Absorption.

funktioniert (MEHLER und BROWN 1952, HEBER und FRENCH 1968, HEBER 1969) und damit eine deutliche, Energie-abhängige Fluoreszenz-Unterdrückung bewirkt oder ob er blockiert ist.

Im Falle der beiden Mutanten Iβ und IIη deutet auch die nicht bis kaum vorhandene Reaktion der Langzeit-Fluoreszenz nach Wechsel der Gasatmosphäre (CO_2-freie Luft - Stickstoff - CO_2-freie Luft: vgl. Abb.9) auf einen schwerwiegenden Defekt in der Elektronentransportkette hin.

10. Lichtstreuung

Parallel zu den beschriebenen Fluoreszenzmessungen wurde mit Hilfe eines zusätzlichen Photovervielfachers auch jeweils die Lichtstreuung auf Anregung mit kurzwelligem bzw. langwelligem Rotlicht hin gemessen (Methodik: HALLIER und HEBER 1977).

Lichtstreuungsänderung messen wir als eine spezifische Änderung der apparenten Absorption; sie erreicht ein Maximum bei 538nm. Interpretiert wird sie als Ausdruck

a) des durch die Belichtung initiierten osmotisch bedingten Schwellens und Schrumpfens ("swelling and shrinkage") der Chloroplasten-Thylakoide (KRAUSE 1973, 1974) sowie
b) der bei Belichtung erfolgenden Veränderung der Ultrastruktur ("conformational change") im Lipidbereich der Thylakoide (HEBER 1969).

Belichtet man intakte Blätter in CO_2-freier Luft mit Breitband-Rotlicht - durch welches beide Photosysteme angeregt werden - so erfolgt im Meßbereich um 538nm im Normalfall zunächst eine sehr schnelle Absorptionszunahme (vgl. Normale in Abb.10).

Dieser erste schnelle Absorptionsanstieg ist auflösbar in eine sehr schnelle und kurze Anfangs-Phase, der eine zweite, nur wenig langsamere kurze Anstiegs-Phase folgt. Diese erste zweiphasige Absorptionszunahme bei Belichtung ist nur bei solchen Blättern in ihre zwei Teilphasen auflösbar, welche zuvor einer Dunkelzeit von einer bis mehreren Minuten unterworfen waren. Folgen Dunkel-Licht-Wechsel in kürzerer Folge, so verschmilzt diese Zweiphasigkeit des Absorptionssignals zu einem einzigen Signal.

Der dritte Teil des 538nm-Absorptionszunahme-Signals besteht in einem weiteren, langsamen und sehr starken Anstieg der Absorption - dem eigentlichen "shrinkage"-Signal - bis auf ein sehr hoch liegendes Dauerzustands-Niveau ("steady state"). Diesen gesamten Signal-Aufbau zeigt deutlich die Normale in Abb.10.

Das Phänomen dieser apparenten Absorptionszunahme mit Maximum bei 538nm spiegelt Licht-abhängige, reversible Ionen- und

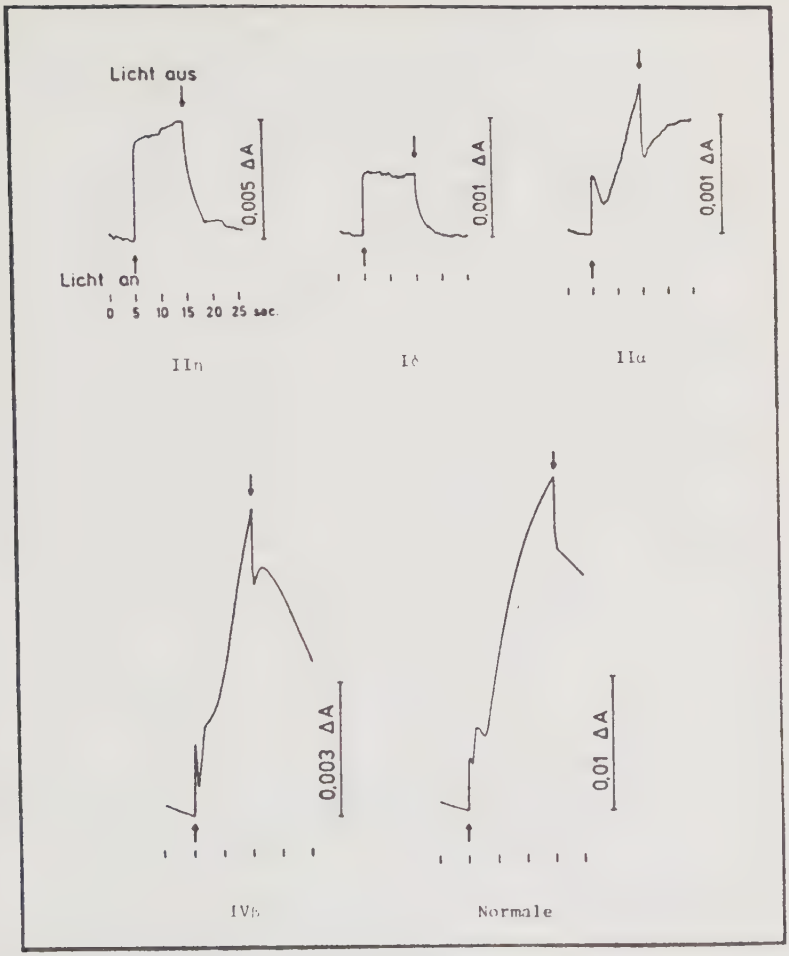


Abb.10
Lichtstreuung bei 538nm an ganzen, intakten Blättern von Oenothera-Mutanten mit unterschiedlichen Defekten im Vergleich zur Normalform. Messung in CO_2-freier Luft; Belichtung: 16,6 W $\times m^{-2}$ Breitband-Rotlicht; Zeitmaßstab bei allen Signalen identisch (vgl. IIη), ΔA variiert.

Wasser-Bewegungen durch die Membranen der Grana-Kompartimente wider (GOOD et al. 1966, PACKER und CROFTS 1967, HEBER 1969).

Hierbei gibt der Hauptteil des Gesamt-Signals bei 538nm, der langsame und starke Absorptionsanstieg zum "steady state", die durch die Belichtung induzierte Verringerung der Chloroplasten-Volumina (KUSHIDA et al. 1964, HILGENHEGER und MENKE 1965, NOBEL 1968, HEBER 1969) bzw. die dadurch hervorgerufene erhöhte Lichtstreuung (TEDESCHI und HARRIS 1958) wieder.
Für den ersten, schnellen, zweiphasigen Absorptionsanstieg auf Belichtung hin gibt es bisher keine sichere Erklärung, zumal in diesem Bereich wohl auch Überlagerungen mit solchen Absorptionsänderungen zu erwarten sind, welche auf Chlorophyll b (Max. etwa bei 513nm) zurückzuführen sind (WITT et al. 1966b). Wahrscheinlich ist diese Absorptionsänderung ("carotenoid shift") Teil des 518nm-Membranpotential-Signals (JUNGE 1977a,b).

Der Hauptteil des 538nm-Signals, d.h. der langsame, ausgeprägte Anstieg der apparenten Absorption auf ein hohes "steady state"-Niveau ist vor allem Indikator für Lichtabhängige Ionen-Fluxe durch die Thylakoid-Membranen (HEBER 1969, KRAUSE 1973). Wie Abb.9 zeigt, verläuft dieser Absorptions-Anstieg parallel zum bereits besprochenen Kautsky-Effekt bei der Fluoreszenz-Messung. Somit sind diese beiden Signale zugleich auch Anzeiger für die Energie-Verhältnisse des Thylakoidsystems, denn beide zeigen das Funktionieren Energie-abhängiger Prozesse an, welche in ihrer Energie-Abhängigkeit an den Elektronentransport gekoppelt sind.

Abb.9 macht außerdem im Vergleich zwischen der Normalen und zwei Mutanten mit blockiertem Elektronentransport die Signifikanz der beiden miteinander korrespondierenden Signale "Fluoreszenzabfall" und "Anstieg der Absorption" für die Beurteilung des Elektronenflusses von Mutanten deutlich. Bei beiden Mutanten der Abb.9 (Iꞩ, IIη) zeigt das Ausbleiben entsprechender Licht-induzierter Signale einmal mehr, daß ihre Elektronentransportkette für eine Ermöglichung der Ionenflüsse nicht ausreicht, welche für

eine Energiekonservierung nach MITCHELL (1966) erforderlich sind. Der Zusammenhang beider Signale wurde auch von KRAUSE (1974) nachgewiesen, der zeigte, daß in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen sowohl der Anstieg der Lichtstreuung bzw. der apparenten Absorption wie auch der Abfall der Fluoreszenz parallel zur Bildung des Protonengradienten durch die Thylakoidmembranen verlaufen. Da von diesem Protonengradienten bzw. von den für seine Bildung notwendigen Kräften -ΔpH und Membran-Potential - die ATP-Bildung der Chloroplasten abhängt, sind bei Blättern Lichtstreuung und Fluoreszenzanteil im "steady state" Kriterien für den Zustand des Energiehaushaltes des Photosynthese-Apparates.

Wechsel der Gasatmosphäre zu N_2 bedeutet - dies ist aus Abb.9 oben bei Wildtyp-Messungen direkt abzulesen - Hemmung des Elektronentransportes, d.h. Blockierung des Elektronenflusses zum O_2 (HEBER 1969): im Experiment äußert sich diese Hemmung als Abnahme der apparenten Absorption und gleichzeitiger Fluoreszenzanstieg; Rückkehr zu O_2 kehrt diese Reaktionen um - der Elektronenfluß geht wieder zum Sauerstoff. Dies gilt allerdings nur für nicht zu geringe Lichtintensitäten (Abb.9 oben: 16,6 $W \times m^{-2}$); andernfalls (Abb.9 unten: 4 $W \times m^{-2}$) kommt es zu erhöhtem zyklischen Elektronentransport, wie das Ansteigen der apparenten Absorption zeigt.

In Abb.10 wurden Lichtstreuungs-Signale verschiedener Mutanten bei 538nm im Vergleich zum Signal der Normalen zusammengestellt. Der Vergleich der sich in diesen Signalen der verschiedenen Mutanten widerspiegelnden Reaktionen macht deutlich, welche Rückschlüsse sich in günstigen Fällen bei Mutanten mit unbekannten Defekten im Bereich der Photosynthese aus den Lichtstreuungs-Signalen ziehen lassen:
Dem normalen Signal am nächsten kommt das der Mutanten IV8, einer Defektmutante mit hohem Chlorophyllgehalt, prinzipiell intaktem Elektronentransport und geringer Rest-Photosynthese. Ihre Letalität ist durch das fast gänzliche Fehlen des Enzyms Ribulosebisphosphat-Carboxylase bedingt (Hallier et al. 1978).

Die vorhandenen Differenzen zwischen den beiden Lichtstreuungs-Signalen der Normalen und der Mutante IVβ sind wohl bedingt durch die bei der Mutante festgestellten und im Vergleich zur Normalen geänderten Elektronentransport-Eigenschaften - wahrscheinlich ein Sekundäreffekt, welcher auf die verminderte Carboxylase-Aktivität und den dadurch gebremsten Kohlenstoff-Umsatz zurückzuführen ist (HALLIER et al. 1978).

Stark verschieden vom normalen 538nm-Signal sind die Lichtstreuungs-Signale der drei Mutanten in der oberen Reihe der Abb.10. Alle drei Mutanten weisen Unterbrechungen des linearen Elektronentransportes auf:

während bei der Mutante II_η beide Photosysteme funktionieren, ist bei ihr das zwischen den beiden Photosystemen angeordnete Cytochrom f nicht nachweisbar (HALLIER und HEBER 1977);

bei der Mutante I_δ verhindert ein Block im Photosystem II das Photosynthetisierungsvermögen (HALLIER 1968, FORK und HEBER 1968). Offensichtlich führen die Defekte dieser beiden Mutanten dazu, daß das 518nm-Membranpotential-Signal auch hier im Bereich von 538nm deutlich wird;

die Mutante II_α schließlich, deren 538nm-Signal unter den Mutanten mit defektem Elektronentransport noch am meisten Ähnlichkeit mit der Reaktion der Normalen zeigt, hat einen Defekt im Bereich des Photosystems I, sodaß die Photosynthese bis auf einen minimalen, in etwa die Atmung ausgleichenden Rest blockiert ist (HALLIER 1968, FORK und HEBER 1968).

Tabelle 10 Informationen aus den Differenz-Spektren und den Lichtstreuungs-Signalen der Mutanten:

1. Lichtabhängige Cytochrom f-Oxidation bei 420nm und 554nm.
2. Lichtabhängige Cytochrom b-Reduktion bei 563nm, 532nm, 429nm.
3. Lichtabhängiges Membranpotential mit Signal-Maximum bei 518nm.
4. Lichtabhängige Erhöhung der Lichtstreuung um 535nm

\+ = Reaktion (unterschiedlicher Stärke)feststellbar

\- = Reaktion nicht vorhanden bzw. nicht feststellbar

Tabelle 10

Informationen aus den Differenz-Spektren der Mutanten

	Lichtabhängige Cyt.f-Oxid.	Lichtabhängige Cyt.b-Red.	Lichtabhängiges Membranpotential stabil	Lichtabhängiges Membranpotential instabil	Lichtabhängige Erhöhung der Lichtstreuung
I α	+	-		+	schwach
I β	-	+ ?		+	-
I γ	+	schwach		schwach	-
I δ	+	+ ?	schwach		-
I ε	-	-	-	-	-
I ζ	-	-	-	-	-
I η	-	+	-	-	-
I θ	-	-	-	-	-
I μ	+	-		+	-
I ν	-	+ ?	-	-	-
I ξ	+	-		schwach	-
I ρ	-	-	-	-	-
I σ	+	+	+		+
II α	schwach	-	+		+
II β	-	+		+	-
II γ	+	-		schwach	-
II δ	+	+	schwach		schwach
II ε	-	+	-	-	-
II ζ	+	-		+	-
II η	-	+ ?		+	-
II θ	-	-	schwach		-
II κ	+	+		+	-
III α	+	-	schwach		-
III β	+	+		+	schwach
IV α	-	+	-	-	-
IV β	+	+	+		+
V α	+	+	+		+
V δ	-	+		+	schwach

Wie die Interpretation des 518nm-Membranpotential-Signals (vgl.Abb.4) schon zeigte, dessen Phasen z.T. mit der Aktivität bestimmter Abschnitte der Elektronentransportkette bzw. mit einem der beiden Photosysteme in Zusammenhang zu bringen sind, so ist auch das 538nm-Lichtstreuungs-Signal (vgl.Abb.10) ein komplexes, auf mehrere Reaktionen zurückzuführendes Signal, dessen Zusammensetzung noch nicht völlig geklärt ist.

Eine Zusammenstellung der Daten, welche sich aus den Differenz-Spektren der Mutanten und aus ihren Lichtstreuungsänderungen ergeben, bringt Tab.10. Diese Informationen gehen in die Einzelbeurteilungen der Mutanten ein.

C. Defekt-Lokalisationen bei verschiedenen Mutanten-Typen

Den meisten der bisher dargestellten Untersuchungsmethoden zur Prüfung des Kohlenstoffwechsels - des Dunkelteiles der Photosynthese - und des Elektronentransportes bzw. der Licht-abhängigen Reaktionen der Photosynthese wurde das gesamte Mutanten-Sortiment mit wenigen, vor allem Material-bedingten, Ausnahmen systematisch unterzogen.

Die bei diesen Untersuchungen erzielten Ergebnisse wurden bereits an Hand charakteristischer Einzelbefunde sowie tabellarisch für das gesamte Sortiment dargestellt.

Resultate komplexerer Natur wurden bisher nur ausschnittsweise und an Hand von Beispielen besprochen. Insbesondere die Absorptions-, Fluoreszenz- und Lichtstreuungsmessungen bedürfen jedoch umfangreicher Interpretation.

Aus den Daten, welche diese Untersuchungen erbrachten, resultiert für fast jede der Mutanten eine Charakterisierung, die etwas über die Art des jeweiligen Photosynthese-Defektes aussagt. Die so charakterisierten Mutantentypen lassen sich nach dem anzunehmenden Defekt-Ort in Gruppen zusammenfassen.

a) Photosystem II-Mutanten: $I\alpha$, $I\gamma$, $I\delta$, $II\gamma$

Eine dieser Gruppen umfasst eine Reihe von Mutanten, die auf Grund der Ähnlichkeit ihres Verhaltens bereits gemeinsam

angesprochen wurden und bei denen es sich offensichtlich um Mutanten mit defektem Elektronentransport handelt. Es sind dies die 5 Mutanten Iα, Iγ, Iδ, IIα und IIγ.

Ihnen allen ist gemeinsam,
daß Chlorphyllmangel nicht der Grund für ihre Letalität sein kann (vgl.Tab.1),
daß ihre Stoffbilanz auch im Licht negativ ist, (vgl. Abb.1),
daß sie ausreichende Photosynthese nicht treiben können, wie die Markierung mit $^{14}CO_2$ während der Photosynthese zeigt (vgl.Tab.3) und
daß sie offenbar über alle Enzyme verfügen, welche für die CO_2-Reduktion und die Regeneration des CO_2-Acceptors RuBP notwendig sind (vgl.Tab.4 und 5).

Daß diese Aussage entgegen dem ersten Anschein (Tab.5) auch für das Vorhandensein der RuBP-Carboxylase bei der Mutante Iγ gilt, zeigen Experimente, mit denen die gesamte Kette der Reaktionen des photosynthetischen Carbon-Zyklus überprüft wurde: Blattextrakte wurden mit ATP, NADPH, $Na^{14}HCO_3$ und Glucose-6-phosphat inkubiert und die Verteilung der Reaktionsprodukte auf einzelne Verbindungen radiochromatograpisch untersucht. Daß Phosphoglycerat bei allen untersuchten Mutanten ebenso wie bei der Normalform das Hauptmarkierungsprodukt bildet, zeigt an, daß der Reaktionsweg vom Hexosephosphat zum CO_2-Acceptor RuBP und weiter zum Phosphoglycerat gangbar ist und daß vor allem auch bei der Mutante Iγ die für die CO_2-Fixierung notwendige RuBP-Carboxylase in ausreichendem Maße vorhanden sein muß.

Danach kann bei dieser Gruppe von Plastom-Mutanten der Photosynthese-Defekt, welcher die Letalität der Mutanten bedingt, nicht auf einem Defekt im reduktiven Pentosephosphatzyklus beruhen.

Zur Untersuchung des Elektronentransportes der Mutanten wurden zunächst Substratpegel und ATP-Pegel im Dunkel-Licht-Wechsel gemessen: bei allen 5 Mutanten sind - zwar unterschiedlich starke, jedoch stets erkennbare - lichtabhängige Schwankungen der PGS- bzw. ATP-Pegel feststellbar

(vgl. Tab.6), jedoch bei der PGS mit Raten, welche die Möglichkeit einer unzureichenden Anlieferung von Cofaktoren zur PGS-Reduktion im Licht, den primären Produkten der Elektronentransportkette - NADPH und ATP - offen lassen.

Dies trifft für die ATP-Versorgung wahrscheinlich nicht zu, da sie - wie Tab.6 zeigt - obwohl vermindert, doch noch deutlich über der CO_2-Fixierungsleistung der Mutanten im Licht liegt, sodaß die ATP-Bereitstellung im Licht durch die Elektronentransportkette nicht der entscheidene limitierende Schritt in der Photosynthese dieser fünf Mutanten sein kann.

Mit der Möglichkeit einer solchen Limitation infolge nicht ausreichender Leistung der Elektronentransportkette muß dagegen beim NADPH gerechnet werden. Wie Tab.7 für vier der fünf Mutanten zeigt, ist NADP-Reduktion zwar prinzipiell nachweisbar, jedoch nur in geringen und nicht ausreichend beweiskräftigen Raten.

Weiteren Aufschluß über das Funktionieren des Elektronentransportes dieser fünf Mutanten geben Absorptions- und Fluoreszenzmessungen.

Die aufgenommenen Spektren der Licht-minus-Dunkel-Differenzen aller fünf Mutanten zeigen die Charakteristika der Photooxidation von Cytochrom f: starke negative Soret-Bande knapp unterhalb von 420nm und α-Bande bei 552 nm.

Cytochrom f ist, wie bereits erwähnt, interessant in seiner Funktion als Redox-Carrier innerhalb der Elektronentransportkette zwischen den beiden Photosystemen - es wird von Photosystem II reduziert, von Photosystem I oxidiert.

An Hand der Kinetiken der Licht-induzierten Absorptionsänderungen bei 420nm, hervorgerufen durch Oxidation/Reduktion von Cytochrom f, läßt sich das Funktionieren der Photosysteme messen. Hierfür läßt sich der Effekt des Hellrot-Dunkelrot-Antagonismus auf den Oxidationszustand des Cytochrom f ausnutzen: Langwelliges Rotlicht von 709nm führt bei normalen Pflanzen durch überwiegende Anregung von Photosystem I zu rascher Oxidation des Cytochrom f, während die Rückreduktion im Dunkeln danach nur langsam verläuft. Bei Belichtung mit Hellrotlicht von 651nm im Anschluß an 709nm-Belichtung

erfolgt rasche Reduktion des Cytochroms f, da dieses kurzwellige Rot Photosystem II stärker als Photosystem I anregt. Diese letztere Hellrot-Wirkung läßt sich durch Zugabe von DCMU aufheben, da dieser Inhibitor Photosystem II blockiert.

Eben diese Wirkung des Hellrots auf die Reduktion des Cytochroms f konnte in den Mutanten Iα, Iγ, Iδ und IIγ nicht beobachtet werden, was - entgegen den Daten der Tab.7, die offenbar nicht aussagekräftig genug sind - auf einen Defekt im Photosystem II hindeutet. Die oxidative Wirkung der Belichtung mit Dunkelrot (709nm) auf die Soret-Bande des Cytochroms f entsprach bei diesen Mutanten derjenigen der Normalen. Im übrigen sind sich die - hier nicht wiedergegebenen- Differenzspektren dieser vier Mutanten wenn auch nicht gleich so doch ähnlich, daß sie nicht gesondert besprochen zu werden brauchen.

Ähnlich sind diese vier Mutanten einander auch in bezug auf ihre Membranpotential-abhängige Absorptionsänderung im Bereich ihres Maximums von 518-520nm bei Belichtung mit Breitband-Rotlicht. Ihre Absorptionssignale gleichen denen normaler Pflanzen, deren Elektronentransport unmittelbar hinter Photosystem II mit DCMU vergiftet wurde, sie reagieren jedoch selbst nicht auf DCMU-Behandlung, was wiederum besagt, daß ihr Photosystem II bereits inaktiviert ist.

Das gleiche Ergebnis erbrachten für die genannten vier Mutanten Messungen der 684nm-Fluoreszenz: auch hier deutet der rasche Fluoreszenzanstieg auf ein gleichbleibendes Niveau - ein Verhalten, das auch mit DCMU vergiftete Normale zeigen - d.h. das sogenannte "Rechteck-Signal", welches auch von verschiedenen langen Dunkelphasen unbeeinflußt bleibt, auf ein nicht funktionierendes Photosystem II hin. In diesem Falle - Block im Photosystem II oder unmittelbar dahinter - bleibt der Quencher Q, der primäre Photooxidant der Elektronentransportkette, unverändert reduziert (QH); er kann nicht oxidiert werden, wenn der Elektronentransport hinter Photosystem II, an dessen Ende er steht, nicht funktioniert, d.h. wenn die Elektronen nicht weiterfließen können.

b) Photosystem I-Mutante: IIα

Ein anderes Verhalten insgesamt zeigt dagegen die Mutante IIα. Bei ihr führt Anregungslicht von 709nm nicht zur - vom Photosystem I bewirkten - Cytochrom f-Oxidation, wie sie die besprochenen vier Mutanten ebenso wie normale Pflanzen zeigen, auch nicht bei Anregung mit Breitband-Dunkelrotlicht hoher Intensität. Erst nach Blockierung des Photosystems II mittels DCMU läßt sich schwache Cytochrom f-Oxidation feststellen. Dieser Befund deutet auf einen Block im Elektronentransport im Bereich des Photosystems I hin.

Daß hingegen das Photosystem II der Mutanten IIα funktioniert, zeigt das Verhalten ihres 518nm-Absorptionsänderungs-Signals auf Breitband-Rotlicht-Anregung hin (BUTLER 1962): die Kinetik dieses Signals weist dieselben Charakteristika auf wie das Signal der Normalen (1. Phase: schneller Anstieg, 2. Phase: weiterer deutlicher, aber langsamer Anstieg. Vgl.Abb.4) und reagiert in der gleichen Weise auf DCMU-Vergiftung des Photosystems II (1. Phase: Verstärkung des schnellen Anfangs-Anstiegs, 2. Phase: weiterer Anstieg wird vollkommen unterdrückt, vgl. FORK und HEBER 1968, fig.3b). Diese Signal-Charakteristika sprechen eindeutig für das Funktionieren des Photosystems II der Mutanten IIα.

Nach ihrem Fluoreszenz-Verhalten ist die Mutante IIα zwischen den bereits besprochenen vier Mutanten und der Normalen einzuordnen. Darauf deutet die Reoxidationszeit des reduzierten Quenchers QH im Dunkeln hin (Normale = 1sec., Mutante IIα = 0,6sec., Mutanten mit defektem Photosystem II = keine Reoxidation, vgl. FORK und HEBER 1968, fig.4). Der Anstieg der variablen Fluoreszenz, welcher die Reduktion von Q widerspiegelt, wird bei der Mutante IIα durch DCMU-Behandlung noch stärker beeinflußt, als dies bei DCMU-vergifteten Normalen der Fall ist.

Somit läßt sich, fasst man alle Ergebnisse der Untersuchungen des Elektronentransportes dieser Mutante zusammen, mit großer Sicherheit sagen, daß das Photosystem I der Mutante IIα blockiert ist und daß ihr Photosystem II

in seiner Funktionstüchtigkeit der Normalen so nahe liegt, daß es höchstens als insignifikant beeinträchtigt eingestuft werden kann.

c) Cytochrom f-Mutanten: Iβ, IIη

Eine weitere Gruppe von Mutanten, bei denen auf Grund der Voruntersuchungsergebnisse ein ähnlicher oder gleicher Photosynthese-Defekt anzunehmen ist,besteht aus den Mutanten Iβ und IIη. Auch diese beiden wurden wegen dieser Ähnlichkeit bereits gemeinsam angesprochen.

Offensichtlich liegt auch bei diesen beiden Mutanten der Defekt-Ort im Bereich des Elektronentransportes, da weder die Pigmentbestimmungen noch die Daten aus dem Bereich des reduktiven Pentosephosphat-Zyklus Anhaltspunkte für einen Defekt ergaben: negative Stoffbilanz, d.h. keine netto-CO_2-Aufnahme im Licht bei Gaswechselversuchen; $^{14}CO_2$-Fixierung in der Größenordnung von 0,3-1% der normalen Leistung hauptsächlich in organischen Säuren und Aminosäuren zu finden (vgl.Abb.2a). Jedoch: Photosynthese-spezifische Enzyme liegen in ausreichender Aktivität vor (vgl. HALLIER und HEBER 1977, Tab.3), PGS- und ATP-Pegel-Schwankungen in Abhängigkeit vom Dunkel-Licht-Wechsel lassen keine Rückschlüsse auf einen möglichen Defekt-Ort zu.
Deutliche Ansätze für eine Einengung des gesuchten Photosynthese-Defektes bieten dagegen die Absorptions-Spektren der Licht-minus-Dunkel-Differenzen beider Mutanten (vgl.Abb.3a). Auffällig beim Vergleich der Differenzspektren beider Mutanten mit demjenigen der Normalen ist der nur kurzfristig und andeutungsweise erfolgende Aufbau eines Membranpotentials. Daraus läßt sich schon mit Sicherheit ableiten, daß - da die Aufrechterhaltung dieses Membranpotentials eines ständigen Elektronenflusses bedarf - der Elektronentransport der Mutanten gestört ist: das bei Belichtung kurzzeitig gebildete Membranpotential bricht sofort wieder zusammen, während die Normale dieses Potential aufrecht zu erhalten vermag (vgl.Abb.3a).

Begleitet wird dieses Signal bei 520nm normalerweise von einer Absorptionsabnahme mit Minimum bei 480nm - dies zeigen sowohl die Normalform (Abb.3a+b) wie auch die Mutanten mit intaktem Elektronentransport (Abb.3b); bei Mutanten mit einem Defekt in der Elektronentransportkette fehlt auch dieses Absorptions-Charakteristikum, wie Abb.3a für die Mutanten Iß und II_η zeigt.

Auch das trogartige Absorptionsminimum im Bereich um 430nm wurde bereits angesprochen. Es zeigt wohl P_{700}-Photooxidation an: die Soret-Bande des Cytochtoms f hat einen deutlich anderen Charakter und erscheint - wie es die Normalform in Abb.3a sehr schön zeigt - als ausgeprägtes Absorptions-Minimum bei 420nm. Dieser charakteristische Abschnitt des Absorptions-Spektrums erscheint ebenso deutlich auch bei Mutanten mit intaktem Elektronentransport (vgl. Abb3b), er fehlt jedoch bei den Mutanten Iß und II_η.

Auch die α-Bande des Cytochroms f bei 554nm, die sich bei Normalen wie bei Mutanten mit intaktem Elektronenfluß als scharf ausgeprägtes Kurven-Minimum zeigt und aus der sich - zusammen mit der Soret-Bande - die Photooxidation des Cytochroms f ablesen läßt, fehlt bei den beiden Mutanten.

Somit ergibt sich aus den Absorptions-Spektren der Mutanten Iß und II_η, daß

a) ihre Elektronentransportkette defekt ist und daß
b) dieser Defekt wohl im Bereich des Cytochroms f zu vermuten ist.

Daß dieser anzunehmende Defekt im Elektronentransport das Photosystem I nicht betreffen kann, zeigen Blattextrakte beider Mutanten durch ihre Fähigkeit zur Photoreduktion von Methylviologen in Gegenwart von Ascorbat und DCPIP mit Raten von 130-280 $\mu mol \times (mg\ Chlorophyll)^{-1} \times h^{-1}$ sehr deutlich: beide Mutanten liegen mit ihren Reduktionsraten noch über denjenigen der Normalform.

Photosystem II läßt sich, wie schon beschrieben, gut an Hand des Fluoreszenzverhaltens prüfen. Wie bereits in Abb.6 dargestellt, sind die beiden Mutanten Iß und II_η in den Charakteristika ihres Fluoreszenz-Signals der Normalen

prinzipiell sehr ähnlich, außer, daß bei der Normalform die Relation der variablen Fluoreszenz zur schnellen Fluoreszenz verringert ist und die zweiphasige Natur der variablen Fluoreszenz noch deutlicher ausgeprägt erscheint. Auch kehrt bei der Normalen die Fluoreszenz in Langzeitmessungen zu einem niedrigeren Niveau zurück, welches nur wenig über der Höhe der schnellen Fluoreszenz F_o liegt. Zu den quantitativen Unterschieden zwischen der Normalen und den beiden Mutanten Iβ und IIη gehört auch das etwas schnellere Ansteigen der variablen Fluoreszenz beider Mutanten. Wie bereits besprochen, drücken sich in diesem Verhalten entweder Poolgrößen-Unterschiede aus - eventuell werden kleinere Pools der Mutanten schneller durchreduziert - oder auch es spiegeln sich unterschiedliche Mengen verfügbarer Photosystem II-Reaktionszentren in diesem verschiedene Reduktionszeiten wiedergebendem Fluoreszenzverhalten wider.

Daß das Fluoreszenzverhalten beider Mutanten von dem der Normalen nur quantitativ und nicht sehr stark verschieden ist, zeigt auch (Abb.7) die Reoxidation des Quenchers Q im Dunkeln, während der Unterschied zu einer Mutante wie IIγ mit defektem Photosystem II gravierend und qualitativ drastisch verschieden ist.

Trotz dieser beschriebenen Unterschiede der beiden Mutanten Iβ und IIη zur Normalen darf man aus den Befunden der Fluoreszenzmessungen schließen, daß beide Mutanten über ein funktionierendes Photosystem II verfügen. Andererseits lassen ihre Langzeit-Fluoreszenz-Reaktionen (Kautsky-Effekt wie auch Reaktionen auf Wechsel der Gasphase zwischen N_2 und O_2 insignifikant) wie auch schon die Ergebnisse der Absorptions-Differenz-Messungen den sicheren Rüschluß zu, daß der offensichtliche Photosynthese-Block im Bereich der Elektronentransportkette liegt.

Ebenso wie im Fehlen des Kautsky-Effektes äußert sich auch im Fehlen der normalerweise miteinander korrespondierenden zweiten Phasen der Signale "Fluoreszenzabfall" bzw. "Anstieg der tatsächlichen (apparenten) Absorption" bei Belichtung im Langzeitversuch (vgl.Abb.9) ein schwerwiegender

Defekt der Elektronentransportkette: ihr Licht-induzierter Elektronenfluß ist Voraussetzung für die Ermöglichung der Ionen-Fluxe durch die Thylakoidmembranen im Licht.

Das Ergebnis der dargestellten Untersuchungen - Defekt in der Elektronentransportkette, aber Funktionsnachweis für beide Photosysteme, zudem deutlicher Hinweis auf Cytochrom f als Defekt-Ort, einen der Redox-Carrier zwischen den beiden Photosystemen (DUYSENS und AMESZ 1962, OLSON und SMILLIE 1963, FORK und URBACH 1965, AVRON und CHANCE 1966, AMESZ und FORK 1967) - erforderte weitere Prüfung des Elektronentransportes im Abschnitt zwischen den beiden Photosystemen, insbesondere im Bereich von Cytochrom f / Plastocyanin.

In der Region der α-Bande des Cytochroms f - um 554nm - zeigten Messungen mit dem Zweistrahlphotometer, dessen Referenzstrahl auf 572,5nm eingestellt war, bei keiner der beiden Mutanten Iβ bzw. IIη im Bereich 545-572,5nm eine Absorptionsabnahme, wenn man die erste schnelle Absorptionsabnahme des Signals auf Rotlicht hin als Funktion der Wellenlänge darstellt (HALLIER und HEBER 1977, fig.7). Eine deutliche Abnahme der Absorption mit Minimum bei 554nm zeigte dagegen die Mutante IIγ, die wegen ihres besser vergleichbaren Chlorophyllgehaltes an Stelle einer Normalen als Referenz diente. Da bei 554nm die maximale Absorption der α-Bande des oxidierten Cytochroms f liegt, zeigt das beschriebene Differenzspektrum eine Cytochrom f-Photooxidation wohl für die Kontrolle, nicht jedoch für die beiden Mutanten Iβ und IIη. Dieser Befund macht es sehr wahrscheinlich, daß die Plastom-Mutation der beiden Mutanten, die dazu führt, daß Cytochrom f vom Photosystem I nicht photooxidiert wird, entweder Cytochrom f selbst oder aber Plastocyanin, den einzigen Elektronen-Überträger zwischen Cytochrom f und dem Pigment des Photosystems I, P_{700}, betrifft.

Cytochrom f-Nachweis durch Oxidation mittels Ferricyanid ist in isolierten Oenothera-Chloroplasten nicht nur durch die Chlorophyll-Absorption erschwert, sondern zusätzlich noch durch Schleim und vor allem Gerbstoffe, an denen Oenothera

reich ist. Wie im methodischen Teil bereits angemerkt (vgl. auch HALLIER und HEBER 1977), läßt sich dieser Nachweis an Aceton-Puder von Oenothera-Thylakoiden durchführen. Diese Aufarbeitung dient einmal der Entfernung der die spektralphotometrische Messung störenden Pigmente. Zum anderen führt sie zur Umwandlung des (ebenfalls die angestrebte Messung im Bereich von 555nm störenden) Cytochroms b_{559HP} (High Potential) in die autoxidable und oxidiert nicht mehr absorbierende und dadurch mit der Cytochrom f-Messung nicht mehr interferierende Form des Cytochroms b_{559LP} (Low Potential).
Wie Abb. 11 zeigt, konnte auf diese Weise Cytochrom f-Oxidation durch Zugabe von Ferricyanid zum Ansatz in der Referenzkuvette (vgl. HALLIER und HEBER 1977) eindeutig nachgewiesen werden, bei den beiden Mutanten Iß und IIn fehlte die Cytochrom f-Bande bei 554nm hingegen.

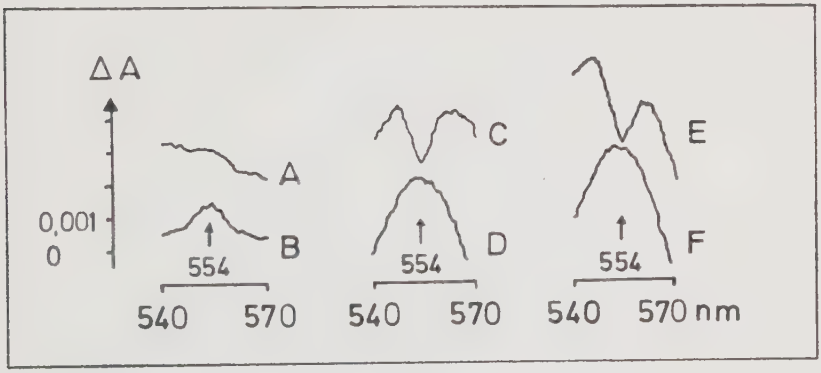


Abb. 11
Differenz-Spektren der Oenothera-Normalform (A,B) und der Mutanten Iß (C,D) und IIn (E,F), gemessen an Acetonpuder-Suspensionen Pigment-freier Thylakoide (Konzentrationen entsprechend 40-60µg $\times ml^{-1}$).

A,C,E = Signale vor der Zugabe von 2mM Ferricyanid zur Referenzkuvette (= Spinat)

B,D,F = Signale nach Ferricyanid-Zugabe zur Referenzkuvette. (Vgl. HALLIER und HEBER 1977)

Einen zusätzlichen Beweis für die Lokalisation des Plastom-Defektes beider Mutanten im Cytochrom f - das entweder nicht vorhanden oder nicht funktionell ist - erbrachten immuno-elektrophoretische Analysen. Deren Ergebnis war, daß Plastocyanin in beiden Mutanten vorhanden ist, während Cytochrom f sich nicht nachweisen läßt (HALLIER und HEBER 1977, BERZBORN unveröff.).

Dies in Verbindung mit den dargestellten Untersuchungsergebnissen vor allem des Elektronentransportes läßt den sicheren Schluß zu, daß der Defekt der Plastom-Mutanten Iβ und IIη tätsächlich im Cytochrom f liegt und daß auch Plastocyanin, Nachbarglied des Cytochroms f in der Elektronentransportkette, nicht als möglicher Wirkort dieser Plastom-Mutation in Frage kommt.

d) Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Mutanten: Iσ, IVβ, Vα

Auf eine dritte Gruppe von einander offenbar ähnlichen Plastom-Mutanten wurde bereits bei der Besprechung von Ergebnissen der Enzym-Aktivitäts-Untersuchungen hingewiesen. Es handelt sich um Mutanten, bei denen niedrige $^{14}CO_2$-Fixierungsraten in Verbindung mit auffallend geringen Ribose-5-phosphat-Umsätzen (zu Ribulose-1,5-bisphosphat) auf einen möglichen Defekt bzw. einen Mangel oder ein Nicht-Vorhandensein der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase hinweisen. Dieser Verdacht ergibt sich für eine Reihe von Mutanten schon aus den Daten der Tabelle 5.

Auf Grund der gemessenen Enzym-Umsatzraten wurden zunächst die Mutanten Iσ, IVβ und Vα einer genaueren Untersuchung unterzogen.

Alle drei Mutanten haben einen von der Normalen nicht sehr verschiedenen Pigmentgehalt, in ihrem Vermögen zur photosynthetischen CO_2-Fixierung liegen zweie von ihnen (Iσ, Vα) im gleichen Bereich wie die meisten Mutanten des Sortimentes, d.h. bei unter 1% des durch normale Pflanzen inkorporierten Kohlenstoffes, wohingegen die dritte Mutante (VIβ) mit ca. 10 µmol fixiertem $^{14}CO_2 \times (mg\ Chlorophyll)^{-1} \times h^{-1}$ die leistungsfähigste aus dem gesamten Mutantensortiment ist. Bei den

Mutanten Iσ und Vα ist zudem auffällig, daß - gemessen am gesamten überhaupt aufgenommenen Kohlenstoff - die Produkte der Dunkelfixierung von CO_2 wie Aspartat und Malat relativ stark markiert werden.

Auffällig ist bei der Sichtung der physiologischen Daten aller drei Mutanten, wie bereits im Zusammenhang mit Tab.5 besprochen, daß bei ihnen als einziges der drei Photosynthese-spezifischen Enzyme (vgl.Tab.4+5) die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase nicht bzw. nur schwach nachweisbar ist.

Ergänzende gelelektrophoretische Untersuchungen zeigten, den Enzym-Aktivitäts-Messungen ganz entsprechend, daß die Mutante IVβ etwas, wenn auch wenig, Fraktion-I-Protein enthält, während dies bei den Mutanten Iσ und Vα nicht nachgewiesen werden konnte - d.h., daß diese über keine RuBP-Carboxylase verfügen. Bei allen anderen Mutanten ebenso wie auch bei der Normalform zeigten sich deutliche Fraktion-I-Banden unterschiedlicher Intensität.

Zur Klärung der Frage, ob die Mutanten eine oder beide der Untereinheiten des Enzyms besitzen (RUTNER und LANE 1967) - eventuell nur nicht zum Fraktion-I-Holoprotein zusammengefügt (BAKER et al. 1977, JENSEN und BAHR 1977) - wurden lösliche Extrakte mit SDS denaturiert und über SDS-enthaltende Gradienten-Gele aufgetrennt. Hier konnten gelegentlich bei der Mutante IVβ sehr schwache Banden in den Positionen der großen bzw. kleinen Untereinheit beobachtet werden, während entsprechende Banden bei den Mutanten Iσ und Vα stets fehlten. (Wir verfügen heute sowohl über den genetischen - CHAN und WILDMAN 1972 - wie auch den biochemischen - BLAIR und ELLIS 1973, SAGHER et al. 1976 - Nachweis, daß die große Untereinheit der RuBP-Carboxylase auf Chloroplasten-Ribosomen unter der Kontrolle von Chloroplasten-DNS synthetisiert wird, während die kleine Untereinheit dieses Enzyms im Kern kodiert ist und seine Synthese außerhalb der Chloroplasten auf Ribosomen des Cytoplasmas erfolgt - ELLIS 1976, 1977 -.)

Weitere Informationen über das Auftreten der RuBP-Carboxylase erbrachten Immunodiffusions-Tests, bei denen Reaktionen eines monospezifischen Antiserums gegen RuBP-

Carboxylase von Roggen als Antikörper mit Roggen- bzw. Oenothera-Extrakten als Antigen benutzt wurden. Hierbei dienen Reaktionen von in den Extrakten der Versuchspflanzen enthaltenen Antigenen mit den Antikörpern des spezifischen Antiserums als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens, in unserem Falle des gesuchten Proteins RuBP-Carboxylase. Sichtbar wird die Reaktion der Antikörper mit den für sie spezifischen Antigenen als Niederschlag, d.h. als Trübungszone im Gel, die sich entsprechend der jeweiligen Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine zwischen den beiden Diffusions-Ausgangspunkten, d.h. den Auftrags-Orten der Lösungen bildet.

Diese Nachweismethode erlaubt über entsprechende Verdünnungen bis hin zu Konzentrationen, deren Präzipitats-Zonen gerade noch wahrnehmbar sind, auch quantitative Aussagen. Alle drei Mutanten zeigen die Immunoreaktion, welche auf RuBP-Carboxylase rückschließen läßt, allerdings in unterschiedlicher und geringer Intensität: die bei ihnen feststellbare Enzymkonzentration liegt bei 12,5% (IVβ) bzw. 3,5% (Vα) bzw. 1% (Iσ) derjenigen der Normalform. Es ist offensichtlich - dies zeigt vor allem der Vergleich mit den Enzym-Aktivitäts-Tests - daß diese serologische Methode nicht nur wesentlich sensibler, sondern auch bedeutend genauer ist als andere Nachweise. Allerdings ist auch interessant und wichtig, daß die drei hier angewandten Untersuchungsmethoden zum Nachweis der RuBP-Carboxylase sich in ihren Ergebnissen nicht nur nicht widersprechen, sondern einander stützen - die Befunde erscheinen nur jeweils deutlicher differenziert und sicherer quantifiziert.

Zur Untersuchung des Elektronentransportes der drei Mutanten wurden zunächst die ATP-Pegel-Messungen im Dunkel-Licht-Wechsel herangezogen sowie die Licht-abhängigen Schwankungen des PGS-Pegels. Da die Abnahme des PGS-Spiegels bei Belichtung die Licht-abhängige Reduktion der PGS zum Triosephosphat wiedergibt, informiert sie indirekt auch über den Nachschub des für die Reduktion erforderlichen ATP und NADPH: bei allen drei Mutanten scheinen weder die ATP-Produktion noch

die Bereitstellung von Reduktions-Äquivalenten die Substrat-Reduktion zu limitieren.

Wie bereits in Tabelle 8 dargestellt, zeigen die Mutanten auch trotz der bereits besprochenen Material-bedingten Schwierigkeiten Vermögen zur Licht-abhängigen Reduktion von DCPIP und Methylviologen. Zwar sind die Raten niedrig,doch liegen sie bei den Mutanten Iσ und Vα in der Größenordnung der Leistung der Normalen, d.h. die geringen Reduktionsraten sind wohl auf Aktivitätsverlust, welcher während der Extraktion eintritt, zurückzuführen. Nur bei der Mutante IVβ liegt die Reduktionsleistung deutlich niedriger, doch ist der Aktivitätsverlust bei dieser Mutante, die ja als einzige CO_2 in nennenswerten Raten reduzieren kann und somit sicherlich über ausreichenden Elektronentransport verfügt, nicht signifikant; außerdem ließ sich die Methylviologen-Reduktionsrate dieser Mutante bis zur Größenordnung der Raten der beiden anderen Mutanten durch Zugabe von Diphenylcarbazid steigern:
Da DPC als Elektronen-Donator für Photosystem II funktioniert, bedeutet eine Steigerung der MV-Reduktionsrate durch DPC-Zusatz bereits vorhandenen Elektronentransport vom Wasser über Photosystem II und Photosystem I zum Methylviologen; das Nicht-Funktionieren der MV-Reduktion ohne DPC-Zugabe ist ohne Bedeutung im Hinblick auf den Block in der Photosynthese der Mutante IVβ.
Abb.3b zeigt die Licht-minus-Dunkel-Absorptionsspektren der drei Mutanten und der Normalen. Hier sind besonders wichtig die Charakteristika des Membranpotentials, das als starke Absorptionszunahme mit Maximum bei 520nm und als Absorptionsminimum bei 480nm in Erscheinung tritt, Zeichen für die Funktion der gesamten Elektronentransportkette, wie bereits besprochen wurde. Auch die Auflösung der Signale in die einzelnen Phasen, aus denen sie sich zusammensetzen, lassen den sicheren Schluß zu, daß in allen drei Mutanten der Elektronentransport ungehindert funktioniert, daß sie in der Lage sind, Licht-erzeugte elektrische Potentialunterschiede durch die Thylakoidmembranen aufzubauen und zu erhalten und daß bei Belichtung ein Protonengradient aufrechterhalten wird, der

erst bei Verdunklung abgebaut wird (z.B. Mutante Iσ in Abb.4 und fig.4 in HALLIER et al. 1978). Außerdem zeigen die Absorptionsspektren aller drei Mutanten wie auch der Normalen mit Absorptionsminima bei 420nm und 555nm Licht-abhängige Cytochrom f-Oxidation.

Auf eine intakte Elektronentransportkette deuten auch ganz klar die Signalcharakteristika und der Langzeitverlauf der 742nm-Chlorophyll-Fluoreszenz hin: Bei Belichtung nach einer längeren Dunkelphase zeigen alle drei Mutanten den gleichen Fluoreszenz-Signal-Aufbau (Lichtintensitätsabhängiger zweiphasiger Fluoreszenz-Anstieg, welcher die Reduktion der Elektronen-Überträger zwischen den beiden Photosystemen widerspiegelt) wie die Normale und nur unbedeutend voneinander abweichenden Verlauf der langsamen Fluoreszenz (Kautsky-Effekt). Das bedeutet, daß die Mutanten Iσ, IVβ und Vα über ein intaktes Photosystem II verfügen.

Diese Aussage wird ergänzt und gestützt durch die gegenläufig zur Fluoreszenz auftretende Zunahme der Lichtstreuung: Fluoreszenzabnahme und gleichzeitige Lichtstreuungszunahme sind bei Pflanzen mit normalem Elektronentransport kinetisch miteinander verknüpft und begleiten einander dementsprechend (vgl.Abb.9). Beides ist als Anzeige für die normalen, Lichtabhängigen Energieverhältnisse der Zelle zu betrachten, beides begleitet die Bildung des Protonengradienten durch die Thylakoidmembran hindurch im Licht - nach MITCHELL ist hiermit die ATP-Bildung durch die Chloroplasten direkt verknpüft (MITCHELL 1966). Somit sind beide Reaktionen als Kriterien für den Energie-Zustand des Photosynthese-Apparates zu betrachten. Ergänzt wird die Aussage dieser Messungen durch die Reaktionen beider Signale auf Wechsel der Gasphase: Bei der Normalen läßt CO_2 die Fluoreszenz ansteigen und vermindert die Lichtstreuung, wahrscheinlich bedingt durch erhöhten ATP-Verbrauch bei CO_2-Reduktion - CO_2-Entzug kehrt beide Signale um; Wechsel von 21% O_2 zu N_2 läßt die Fluoreszenz drastisch ansteigen und verringert die Lichtstreuung deutlich - der Elektronentransport zum Sauerstoff ist blockiert, die eingestrahlte Lichtenergie wird zu einem größeren Teil als Fluoreszenz abgegeben, der

durch den Elektronentransport gespeiste Energiehaushalt der Zelle bricht zusammen.

Im Vergleich hierzu zeigt die Mutante IVß eine ähnliche, wenn auch wesentlich schwächere Reaktion auf CO_2, während die beiden Mutanten Iσ und Vα gar nicht auf CO_2 reagieren: Ergänzung des früheren Befundes (vgl.Tab.3), daß die Mutante IVß über eine deutliche, wenn auch geringe, Rest-Photosynthese-Kapazität verfügt, während die beiden anderen Mutanten nur über ein so geringes Vermögen zur CO_2-Fixierung verfügen, daß es bei Veränderung der CO_2-Konzentration in der Gasphase nicht sichtbar wird.

Die Reaktion des Lichtstreuungs-Verhaltens auf Wechsel der Gasphase zu N_2 deutet bei den drei Mutanten darauf hin, daß bei ihnen im Gegensatz zur Normalen das - nachgewiesenermaßen intakte - Photosystem II nicht dermaßen effizient mit Photosystem I verknüpft zu sein scheint, daß es letzteres zu "überreduzieren" imstande wäre, wenn kein Elektronen-Akzeptor wie Sauerstoff zur Verfügung steht. (Vgl. HALLIER et al. 1978, fig.7). Dieser Befund läßt die Möglichkeit offen, daß die Mutation der drei Mutanten nicht nur die RuBP-Carboxylase, sondern auch den Elektronentransport betrifft, doch ist eher anzunehmen, daß - wie noch zu begründen sein wird - letzterer Defekt als Sekundäreffekt zu betrachten ist.

D. Defekt-Analysen des restlichen Mutanten-Sortimentes

Aus dem bearbeiteten und hier zu besprechenden Sortiment von insgesamt 28 Plastom-Mutanten wurden bisher 10 Mutanten - die vier verschiedenen Gruppen von Mutanten-Typen angehören - als Beispiele detaillierter besprochen und auf die Lokalisation ihres Defekt-Ortes hin analysiert.

Die vorliegenden und in den Tabellen 1-6, 9+10 zusammengestellten Daten erlauben auch für die übrigen Mutanten des Sortimentes eine Analyse bzw. Eingrenzung der anzunehmenden, durch die jeweilige Plastom-Mutation bewirkten Defekt-Orte.

Diese Befunde, die im Einzelfall noch zu ergänzen wären, ermöglichen folgende Beurteilung der Mutanten:

I_{ε}: Das Differenzspektrum zeigt, daß der Mutante kein nennenswerter Elektronentransport möglich ist; ein Membranpotential kann die Mutante nicht aufbauen, eine Lichtabhängige Erhöhung der Lichtstreuung zeigt sich nicht. Diese Information wird ergänzt und gestützt durch die Resultate der Fluoreszenzmessungen: ein Kautsky-Effekt tritt nur sehr schwach auf, die schnelle Fluoreszenz zeigt ein Rechteck-Signal; d.h., daß beide Photosysteme nicht funktionell sind.
Damit bietet diese Mutante keinen konkreten Ansatzpunkt zur Analyse, eine Schwierigkeit, die bei den meisten derjenigen Mutanten auftaucht, welche praktisch keine Elektronentransport-Reaktionen zeigen. Genauer untersucht werden müßten zunächst noch die Photosynthese-spezifischen Dunkelreaktionen, insbesondere die Enzym-Aktivitäten der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase sowie der Ribulosebisphosphat-Carboxylase.

I_{ζ}: Die Mutante zeigt weder den Aufbau eines Membranpotentials noch ein Lichtstreuungs-Signal im Bereich um 535nm, auch der Kautsky-Effekt der Langzeit-Fluoreszenzmessungen tritt nur sehr schwach auf. Da andererseits das Signal der schnellen Fluoreszenz ziemlich normal und zweiphasig ist - was ein intaktes Photosystem II anzeigt - handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Mutante mit defektem Photosystem I, möglicherweise auch mit einem Defekt zwischen den beiden Photosystemen. Genauer zu untersuchen wäre auch noch die RuBP-Carboxylase, da die Aktivität dieses Enzyms vor allem im LILLEY-WALKER-Test auffällig niedrig ist.

I_{η}: Diese Mutante ist besonders schwer zu beurteilen, da sie - sehr chlorophyllarm - offenbar über ein intaktes Photosystem II verfügt, wie die schnelle Fluoreszenz anzeigt und auch ihr Photosystem I zumindest noch in der Lage ist, Cytochrom b zu reduzieren. Ihr Differenz-Spektrum zeigt nur minimale Ausschläge (vgl.Abb.5), Cytochrom f-Oxidation ist nicht erkennbar. Zu prüfen wäre, ob die aus dem Differenz-Spektrum entnommene Cytochrom b-Reduktion zu bestätigen ist,

d.h. ob Photosystem I wirklich funktioniert. Außerdem muß die Enzym-Aktivität der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase näher untersucht werden, da für dieses Enzym relativ niedrige Umsatz-Raten gemessen wurden.

I_0: Auch diese sehr chlorophyllarme Mutante verfügt über ein intaktes Photosystem II (vgl.Tab.9: schnelle Fluoreszenz), zeigt aber darüber hinaus außer einem sehr schwachen Kautsky-Effekt keinerlei Reaktionen, die im Zusammenhang mit dem Elektronentransport stehen: weder Cytochrom f-Oxidation noch Cytochrom b-Reduktion, weder den Aufbau eines Membranpotentials noch ein 538nm-Lichtstreuungs-Signal. Daß der gesamte Energiehaushalt nicht funktioniert, zeigen auch deutlich die ATP- und PGS-Pegel-Messungen im Dunkel-Licht-Wechsel. Sehr stark ist bei dieser Mutante der Verdacht auf einen Defekt im Bereich der RuBP-Carboxylase, wie Tab.5 anzeigt.

I_μ: Sehr grün, zeigt diese Mutante praktisch alle Elektronentransport-Reaktionen: ein normales Differenz-Spektrum, ein deutliches, jedoch instabiles Membranpotential und Cytochrom f-Oxidation. Daß der Energie-Haushalt nicht in Ordnung ist, zeigen neben dem erwähnten 518nm-Signal des Membranpotentials der nur sehr schwache Kautsky-Effekt und die gut sichtbare, jedoch einphasige schnelle Fluoreszenz. Beide Photosysteme sind demnach intakt, möglicherweise deutet die Abweichung im Signal der schnellen Fluoreszenz auf Plastochinonmangel hin. Auch die Möglichkeit eines Defektes zwischen den beiden Photosystemen wäre noch genauer zu prüfen, doch liegt ein Defekt im Carbon-Zyklus sehr nahe. Dieser ist - wie die Tab.4+5 zeigen in erster Linie bei der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zu suchen.

I_ν: Eine sehr chlorophyllarme, im Differenz-Spektrum keine Elektronentransport-Reaktionen mehr zeigende Mutante (vgl.Abb.5) - eventuelle Ausnahme: schwache Cytochrom b-Reduktion - die praktisch keine CO_2-Reduktion mehr durchführen kann. Die positiven Ergebnisse der Fluoreszenz-Messungen lassen den Schluß zu, daß Photosystem II sicher, Photosystem I wahrscheinlich intakt ist. Tab.5 zeigt, daß bei dieser Mutante sehr wahrschein-

lich die RuBP-Carboxylase nicht vorhanden bzw. nicht funktionell ist.

Iξ: Die schnelle Fluoreszenz zeigt bei dieser Mutante ein defektes Photosystem II an, während Photosystem I intakt ist: Cytochrom f wird im Licht oxidiert, bleibt jedoch im Dunkeln partiell oxidiert. Da auch das P_{700}-Signal im Differenz-Spektrum erkennbar ist, liegt der Defekt bei dieser Mutante im Bereich des Photosystems II, eventuell auch zwischen den beiden Photosystemen, dann jedoch vor dem Cytochrom f.

I_ρ: Das Differenz-Spektrum zeigt keine Reaktionen des Elektronentransportes. Die Fluoreszenz-Messungen deuten auf ein defektes Photosystem II hin: einerseits zeigt die schnelle Fluoreszenz nahezu ein Rechteck-Signal, andererseits aber wird ein Kautsky-Effekt bei der Messung der Langzeit-Fluoreszenz sichtbar, d.h. der Defekt liegt sehr wahrscheinlich im Bereich des Photosystems II, das jedoch über eine gewisse Rest-Aktivität verfügen muß.

Sicherheitshalber müßten bei dieser Mutante auch noch die Photosynthese-spezifischen Enzyme geprüft werden, von denen bisher keine Aktivitäts-Daten vorliegen.

IIβ: Photosystem II ist, wie die Fluoreszenz-Daten zeigen, intakt, ebenso wohl Photosystem I, das Cytochrom b im Licht reduziert. Ein Membranpotential wird deutlich aufgebaut, ist jedoch instabil, d.h. der Elektronenfluß ist gestört; vgl. auch das Fehlen des Kautsky-Effektes sowie des 538nm-Signals. Auffällig ist das Fehlen der Cytochrom f-Oxidation im Licht, somit liegt sehr wahrscheinlich ein Cytochrom f-Defekt vor.

In Betracht zu ziehen sind jedoch auch die NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, die keine sehr hohe Aktivität aufweist sowie auch die RuBP-Carboxylase, deren Aktivitäts-Daten uneinheitlich sind.

IIδ: Diese mit 69% des normalen Chlorophylls sehr grüne Mutante zeigt mit ihren Reaktionen aus Fluoreszenz-Messungen und Differenz-Spektrum, daß - obwohl beide Photosysteme intakt sind - der lineare Elektronentransport dennoch gestört ist. Nur schwach treten sowohl Kautsky-Effekt wie auch Membranpoten-

tial und Lichtstreuungs-Erhöhung im Licht auf. Ungewöhnlich ist der einphasige Anstieg der schnellen Fluoreszenz - sehr wahrscheinlich liegt der Defekt, d.h. die Limitation des Elektronenflusses, zwischen den beiden Photosystemen, genauer: zwischen Photosystem II und Plastochinon oder zwischen Plastochinon und Cytochrom f.

Nicht ganz auszuschließen ist nach den bisher vorliegenden Daten auch ein Defekt im Bereich des Calvin-Zyklus, da die Aktivitäten aller Photosynthese-spezifischen Enzyme nicht übermäßig hoch liegen bzw. - bei der RuBP-Carboxylase - uneinheitlich sind.

IIε: Eine sehr chlorophyllarme Mutante, die so gut wie kein CO_2 fixieren kann, deren beide Photosysteme funktionieren: normale schnelle Fluoreszenz, Fähigkeit zur Photoreduktion von Cytochrom b. Das Differenz-Spektrum liefert sonst keine weiteren Informationen, auffällig ist jedoch, daß Cytochrom f fehlt bzw. nicht aktiv ist und daß auch P_{700} nicht festzustellen ist, sodaß der Defekt sehr wahrscheinlich bei einem dieser beiden Glieder der Elektronentransportkette liegt.

IIζ: Das Photosystem II dieser Mutante ist, wie die schnelle Fluoreszenz zeigt, defekt, Photosystem I dagegen - vielleicht vermindert - intakt. Der Kautsky-Effekt tritt nur schwach auf, ein Membranpotential wird gebildet, ist jedoch instabil, während eine Erhöhung der Lichtstreuung bei 538nm nicht festzustellen ist.

Zu prüfen ist noch die Enzymaktivität der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase wie auch der Phosphoribulokinase, von denen noch keine Daten vorliegen, doch liegt der Defekt mit großer Wahrscheinlichkeit im Photosystem II.

IIθ: Das Signal der schnellen Fluoreszenz zeigt normale Funktion des Photosystems II an. Im Differenz-Spektrum wird deutliche P_{700}-Oxidation neben nur schwacher Cytochrom f-Oxidation sichtbar. Dies im Zusammenhang mit einem schwachen Membranpotential-Signal und dem Fehlen von Kautsky-Effekt und 538nm-Lichtstreuungssignal deutet einen Defekt im Elektronentranport zwischen den beiden Photosystemen an. Doch bedarf es auch einer Prüfung der Photosynthese-spezifischen Enzyme,

da hier z.T. Daten fehlen, z.T. (RuBP-Carboxylase) die vorliegenden ^{14}C-Daten bzw. Enzymaktivität nicht übereinstimmen.

IIκ: Mit fast 60% des normalen Chorophyllgehaltes und knapp 6% der CO_2-Fixierungsleistung der Normalen zählt diese Mutante zu den wenigen beschränkt, d.h. unter Schwachlichtbedingungen, lebensfähigen Typen, welche nicht völlig von der Kombination mit und der Ernährung durch eine Normale abhängig sind. Eine ganze Reihe von Elektronentransport-Reaktionen treten zwar auf, zeigen aber Abweichungen von der Norm. So ist das Signal der schnellen Fluoreszenz zwar kein Rechtecksignal eines defekten Photosystems II, zeigt aber nicht die normale Zweiphasigkeit, d.h. es existieren offenbar nicht die üblicherweise an diesem Signal abzulesenden zwei "pools" reduzierbarer Elektronenüberträger (vgl.Abb.6). Ein Membranpotential-Signal tritt zwar auf, ist aber instabil, die 538nm-Lichtstreuungs-Reaktion fehlt ganz, doch stellt sich bei der Langzeit-Fluoreszenz ein deutlicher Kautsky-Effekt ein. Das Differenz-Spektrum (Abb.5) zeigt Cytochrom f-Oxidation und Cytochrom b-Reduktion. Eine mögliche Erklärung für das heterogene Bild, das diese Mutante bietet, wäre eine (partielle) Entkopplung des Elektronentransportes von der ATP-Synthese. Nach den vorliegenden Daten ist eine Defekt-Lokalisation weder in Teilbereichen des Elektronentransportes noch bei den Photosynthese-spezifischen Enzymen möglich.

IIIα: CO_2-Fixierungsdaten fehlen, doch zeigen die Gaswechselmessungen, daß Belichtung nicht zur CO_2-Aufnahme, sondern nur zu leicht erhöhter Atmung führt. Die Photosynthese-spezifischen Enzyme des Calvin-Zyklus zeigen ausreichende Aktivität. Das Signal der schnellen Fluoreszenz (nahezu ein Rechteck-Signal) zeigt einen Defekt im Photosystem II an, doch steht dies im (z.Zt. noch nicht auflösbaren) Widerspruch zum Kautsky-Effekt, der bei der Langzeit-Fluoreszenz sichtbar wird. Der anzunehmende Photosystem II-Defekt wird bestätigt durch die Ähnlichkeit des Differenz-Spektrums mit dem der Mutante Iγ.

IIIβ: Bei dieser Mutante ist der Elektronentransport im Prinzip in Ordnung, wie vor allem die schnelle Fluoreszenz, das - allerdings schwache - 538nm-Lichtstreuungs-Signal und auch die Cytochrom f-Oxidation im Licht zeigen. Auch der hohe Chlorophyllgehalt von 60% der Normalen und die relativ hohe CO_2-Fixierungsrate deuten darauf hin. Das Fehlen des Kautsky-Effektes und die Instabilität des Membranpotentials deuten auf eine mögliche Entkopplung, d.h. einen Defekt im Bereich der vom Elektronentransport abhängigen ATP-Synthese hin.

IVα: Eine sehr chlorophyllarme Mutante mit sehr geringer CO_2-Reduktion (Dunkelfixierung?), deren Photosystem II intakt ist, wie die schnelle Fluoreszenz zeigt. Daß das Elektronentransportsystem defekt ist, zeigen das Fehlen des Membranpotentials, des 538nm-Signals und des Kautsky-Effektes. Da auch Cytochrom f-Oxidation im Licht nicht nachweisbar ist, liegt der Defekt entweder zwischen den beiden Photosystemen oder im Bereich des Photosystems I.

Vδ: Diese Mutante zeigt praktisch keine CO_2-Fixierung, wenig Chlorophyll, aber ausreichende Aktivität der Photosynthese-spezifischen Enzyme. Photosystem II ist intakt, wie das Fluoreszenz-Signal anzeigt. Das Differenz-Spektrum liefert kaum Informationen, die nur sehr schwach auftretenden Signale von Langzeit-Fluoreszenz, Membranpotential und 538nm-Lichtstreuung lassen einen Defekt im Photosystem I vermuten.

Diskussion: In der Zelle besteht ein ausgewogenes, genetisch fassbares Zusammenspiel zwischen Plastom und Genom (STUBBE 1959, 1963, 1966). (Der Vollständigkeit halber ist in diesem Zusammenhang auch noch das Chondriom zu nennen, d.h. die Gesamtheit der in den Mitochondrien lokalisierten Erbanlagen.) Vom genetischen Zusammenwirken der drei Zell-Kompartimente Kern/Cytosol - Plastiden - Mitochondrien hängen Existenz und Evolution pflanzlicher Organismen ab.

Wie der mendelnde Erbgang vieler Mutanten mit mutierten Chloroplasten anzeigt, ist häufig eine Veränderung des im Zellkern lokalisierten Genoms für solche Defekte innerhalb der Plastiden verantwortlich.

Für die hier bearbeiteten Mutanten von Oenothera gilt hingegen die bereits 1922 von RENNER publizierte Defekt-Interpretation, welche durch die genetischen Analysen von STUBBE (1959, 1960) bestätigt wurde: bei ihnen zeigt der an die Plastiden gekoppelte Erbgang, daß der in Erscheinung tretende Defekt mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Veränderung des Plastoms zurückzuführen ist.

Wie wir heute wissen, besteht die DNS der Plastiden - und nicht nur die DNS der Plastiden höherer Pflanzen (BEHN und HERRMANN 1977) - aus identischen zirkulären Molekülen (Genophore, "Chromosomen") (KOLODNER und TEWARI 1975, HERRMANN et al. 1975), die im Stroma der Organelle als sogenannte Nucleoide organisiert sind (KOWALLIK und HERRMANN 1972). Jedes dieser Nucleoide kann mehrere Kopien der DNS-Moleküle enthalten.

Jeder einzelne Chloroplast einer ausdifferenzierten Parenchymzelle dürfte 50-100 Kopien des Genophors enthalten, doch schwankt die Zahl der Nucleoide und damit der DNS-Moleküle beträchtlich in Abhängigkeit von der Größe und dem Entwicklungszustand des Organells. Die hohe Plastiden-DNS-Redundanz ist wohl als sehr effektive genetische Pufferung zu verstehen.

In den vergangenen Jahren ist es gelungen, den Satz der plastidären Gene zu isolieren, aus physikalisch-chemischer Sicht zu charakterisieren und im Molekül zu kartieren. Dies war der erste Schritt zur Identifizierung der Funktionen plastidärer Genophore und zur Gewinnung erster Erkenntnisse der genetischen Kooperation zwischen den Kompartimenten auf molekularer Ebene.

Einige Informationen der plastidären DNS sind heute bekannt. Unter diesen bisher bekannt gewordenen und kartierten Funktionen der Plastiden sind vor allem Gene für strukturelle RNS, d.h. für RNS der Organell-eigenen (70S) Ribosomen (BOHNERT et al. 1976, CROUSE et al. 1978, ROCHAIX und MALNOE 1978, GRAY und HALLICK 1978) und für einen wahrscheinlich kompletten Satz Organell-spezifischer tRNS (DRIESEL et al. 1979); außerdem sind hier zwei Polypeptidgene - das für die größere der beiden Untereinheiten der Ribulosebisphosphat-Carboxylase (COEN et al. 1977) und für ein Thylakoidpolypeptid noch unbekannter Funktion (BEDBROOK et al. 1978) - zu nennen.

Demnach ist die Plastiden-DNS Teil der Kompartiment-spezifischen genetischen Steuerung und der Photoautotrophie, doch erfüllt sie die Aufgabe der Regelung dieser fundamentalen Prozesse nicht allein. Die genetischen Arbeiten von WILDMAN und Mitarbeitern (CHEN et al. 1976) an der Ribulosebisphosphat-Carboxylase, einem multimeren Enzym der löslichen Protein-fraktion, zeigten, daß Plastom und Genom kooperieren.

Dieses Enzym besteht aus zwei unterschiedlichen Unter-einheiten, deren größere, katalytische, nicht mendelnd ver-erbt (CHEN et al. 1976) und im Chloroplasten synthetisiert wird (BLAIR und ELLIS 1973), wo sie auch kodiert ist (COEN et al. 1977) und von wo aus möglicherweise sogar Proteinsynthese des Kern-Cytosol-Raumes beeinflußt wird (S.Diskussion in: HALLIER et al. 1978 und SCHMITT 1978, aber auch ELLIS et al. 1978).
Die kleine Untereinheit hingegen entstammt dem Zellkern: sie zeigt einen mendelnden Erbgang (CHEN et al. 1976), wird im Cytoplasma synthetisiert und in das Organell importiert (DOBBERSTEIN et al. 1977).

Es gibt weitere Hinweise für den bezüglich des Kodierungsortes dualen Ursprung plastidärer Strukturen: So beispielsweise eine Thylakoidkomponente wie die membrangebundene ATP-Synthetase (CF_1 - CF_0), von deren acht Untereinheiten wahrscheinlich sechs in der Plastide und zwei im Cytosol synthetisiert werden (MENDIOLA-MORGENTHALER et al. 1976, NELSON et al. 1980).

Zu den weiterhin bekannten Steuerfunktionen des Plastoms zählt die Kontrolle über das Cytochrom f (HALLIER und HEBER 1977), aber auch spezifische Elektronentransport-Reaktionen scheinen vom Plastom kodiert zu sein (FORK und HEBER 1968, HALLIER 1968, HALLIER und HEBER 1977).

Wesentliche Aspekte der Funktionen des Plastoms und seines Zusammenwirkens mit dem Genom sind jedoch noch unverstanden: nur etwa 10% der potentiellen genetischen Information plastidärer Genophore sind bisher erfasst.

Bei der Untersuchung von Mutanten mit Stoffwechseldefekten, wie sie die hier bearbeiteten Plastom-Mutanten darstellen, erhebt sich angesichts der Befunde stets die prinzipielle Frage, ob der festgestellte Defekt - in unserem Falle die jeweiligen Störungen im Mechanismus der Photosynthese - primärer oder sekundärer Natur ist.

Das bedeutet: stellt jede dieser Störungen einen Primäreffekt, d.h. den direkten Ansatzpunkt der Mutation dar (bzw.: das Protein, welches infolge einer Veränderung des genetischen Materials fehlerhaft oder nicht synthetisiert wurde) oder ist der gefundene Defekt nur Resultat einer Störung eines komplizierten Stoffwechselsystems, welche durch einen Fehler an ganz anderer Stelle der physiologischen Wirkungsreihe verursache wird.

Sinnvoll ist eine physiologisch-chemische bzw.-physikalische Bearbeitung der Mutanten sicher nur in ersterem Falle, d.h. wenn sich mit diesen Untersuchungen das eine Ende einer Genwirkkette aufdecken läßt. Nur dann nämlich bieten solche Defekt-Lokalisationen die Möglichkeit, das Plastom in einzelne Erbfaktoren aufzugliedern, d.h. in

Einheiten, welche unabhängig voneinander mutieren können. Nur dann läßt sich auch abstecken, wie weit eigentlich die genetische Selbständigkeit der Plastiden reicht, worauf sie sich erstreckt, d.h. welche zellulären physiologischen Prozesse von den in den Plastiden lokalisierten Erbanlagen gesteuert werden.

In letzterem Falle, d.h. wenn sich nur Sekundäreffekte fassen ließen, wären solche Untersuchungen nicht sehr fruchtbar, da sie dann ja nur weiter verfeinerte phänomenologische Betrachtungen darstellten.

Die besondere Schwierigkeit der Mutanten-Untersuchungen liegt darin, daß mit ihrer Hilfe innerhalb einer biochemischen Kausalkette, von der wir nicht alle Glieder kennen, Ursachen und Wirkungen aufgedeckt werden sollen.

Für die Annahme, daß die bei den hier untersuchten Plastom-Mutanten festgestellten Defektstellen tatsächlich primärer Natur sind, spricht zunächst vor allem die Tatsache, daß bei allen Mutanten die Struktur der Chloroplasten eine mit dem Alter zunehmende Desorganisation erfährt, d.h. daß die Chloroplasten in einem mehr oder weniger jungen Stadium elektronenoptisch intakt erscheinen - zumindest nicht allzusehr geschädigt sind -(KUTZELNIGG et al. 1975b), dennoch aber in keinem Altersstadium zur (ausreichenden) Photosynthese fähig sind.

Handelte es sich dagegen bei den verschiedenen lokalisierten Defektstellen um Schädigungen sekundärer Art, so wäre sehr wahrscheinlich zu erwarten, daß ein ursprünglich, d.h. bei jungen Blättern vorhandenes Vermögen zur Photosynthese erst im Laufe und als Folge einer fortschreitenden Desorganisation der Chloroplasten-Feinstruktur verloren ginge.
Mindestens bei einem Teil der Mutanten - vor allem bei den beiden Mutantengruppen mit einem Defekt im Bereich eines der Photosysteme bzw. bei den Mutanten, bei denen sich kein Cytochrom f nachweisen läßt - muß man sicher davon ausgehen, daß

- Konsequenz einer Störung der Elektronentransportes, d.h. der photosynthetischen Energieleitung - Photooxidation als Ursache sekundärer Art mit zunehmendem Alter mehr und mehr an zusätzlicher Bedeutung gewinnt.

Solche photooxidative Prozesse können unter bestimmten Verhältnissen, so bei Mutanten mit einem Rest an photosynthetischem Leistungsvermögen, zur Letalität der Mutanten beitragen.

An dieser Stelle der Diskussion der Untersuchungsergebnisse muß auch auf die elektronenmikroskopischen Befunde verwiesen werden, die ja gerade bei den Mutanten mit defektem Elektronentransport eine wohl in erster Linie als Folge von Photooxidation aufzufassende deutliche Reduzierung des Thylakoid-Feinbaues im Vergleich zu normalen Chloroplasten zeigen. Da ein normaler Ablauf des Elektronentransportes über die gesamte Elektronentransportkette hin direkt an die Feinstruktur der Plastiden gebunden ist, wird eine photooxidative Zerstörung des Membransystems zwangsläufig zur Störung eines etwaigen Elektronentransportes und letztlich zur Letalität führen (KANDLER und SCHÖTZ 1956).

Für die Annahme, daß die Blockierung der Photosynthese, wie sie die untersuchten Mutanten zeigen, tatsächlich auf die festgestellten Defekte als Primäreffekte der Plastommutationen zurückzuführen ist und diese nicht als Sekundäreffekte zu betrachten sind, spricht im übrigen sehr stark die Tatsache, daß sich bei allen Mutanten, deren Defekte bisher lokalisiert wurden, diese Störungen eng eingrenzen ließen. Als Sekundäreffekte sollte man eher unspezifische Schäden des gesamten Photosynthese-Apparates erwarten, nicht so sehr Defekte an eng einzugrenzenden, kurzen Abschnitten oder distinkten Einzelgliedern, wie sie sich tatsächlich feststellen ließen.

Ein weiteres Argument dafür, daß es sich bei den lokalisierten Defekten tatsächlich um Primäreffekte der jeweiligen Mutationen des Plastoms handelt, ist der Befund,

daß nach den bisherigen Untersuchungen keine Plastom-Mutante als mit einer anderen identisch zu betrachten ist: jede der genauer untersuchten zehn Mutanten hat ihre besondere Eigenart und selbst bei den auf Grund gleichartiger Defekte zusammengestellten Gruppen weist jede einzelne Mutante deutliche Besonderheiten auf, die sich teils im unterschiedlichen Grad der Photosynthese-Schädigung bzw. der Höhe der Rest-Photosyntheseleistung, teils im unterschiedlichen Spektrum der Reaktionen des Elektronentransportes, teils auch schon in makroskopisch feststellbaren Differenzen wie Ergrünungsgrad und Starklichtempfindlichkeit ausdrücken.

Dies zeigt die folgende vergleichende Zusammenstellung der Mutanten-Charakterisierungen, die zu definierten Defekt-Lokalisationen geführt haben:

I_α: Photosystem II-Mutante (FORK und HEBER 1968) mit relativ hohem Chlorophyllgehalt (55% der normalen Gesamtchlorophyllmenge) und mit über 35% der Normalleistung im Vergleich zu den übrigen Mutanten relativ hohem Rest-CO_2-Fixierungsvermögen.

I_γ: Photosystem II-Mutante (HALLIER 1968, FORK und HEBER 1968) mit niedrigem Gesamtchlorophyllgehalt (20% desjenigen der Normalen) und nur ca. 0,5% des "normalen" Fixierungsvermögens, mit diesem jedoch nicht vergleichbar, da es wohl als reine Dunkelfixierung (vgl.Abb.1) anzusehen ist.

I_δ: Photosystem II-Mutante (HALLIER 1968, FORK und HEBER 1968) mit einer der Mutante I_α sehr ähnlichen Pigmentausstattung und sehr schwachem Rest-CO_2-Fixierungsvermögen, das jedoch noch geringer ist als z.B. bei der noch Chlorophyll-ärmeren Mutante I_γ.

II_γ: Photosystem II-Mutante (HALLIER 1968, FORK und HEBER 1968) mit Pigmentausstattung ähnlich der Mutante I_γ, jedoch mit im Vergleich zur I_γ knapp halb so hoher CO_2-Fixierung, die zudem in den normalen Fixierungsprodukten von der PGS bis zu den Zuckerphosphaten nicht mehr nachweisbar ist.

II_α: Photosystem I-Mutante (FORK und HEBER 1968) mit relativ hohem Chlorophyllgehalt, aber im Vergleich zu ähnlich pigmen-

tierten Mutanten wie z.B. Iα sehr geringem Vermögen zur CO_2-Fixierung.
Schon der Vergleich dieser fünf Mutanten untereinander macht deutlich, daß bei Plastom-Mutanten Pigmentausstattung und CO_2-Fixierungsvermögen nicht wie bei der Normalen in ziemlich direktem Zusammenhang stehen. Dies ist nicht erstaunlich, wenn - wie bei diesen Mutanten - die Fixierung des CO_2 wahrscheinlich überwiegend bis ausschließlich auf dem Wege der CO_2-Incorporation über die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase erfolgt. Die unterschiedlichen Fixierungsraten zeigen jedoch deutlich, daß von Mutante zu Mutante individuelle physiologische Unterschiede bestehen.

Iβ: Cytochrom f-Mutante (HALLIER und HEBER 1977) mit ca. 28% des Chlorophylls der Normalen, aber auch im Vergleich mit ähnlich pigmentierten Mutanten niedriger CO_2-Fixierung, die sich jedoch - wenn auch schwach - bis in die Zuckermonophosphate verfolgen läßt. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante IIη: ebenfalls eine Cytochrom f-Mutante (HALLIER und HEBER 1977) etwa den gleichen Chlorophyllgehalt, aber eine deutlich höhere CO_2-Fixierungsleistung, doch findet sich der fixierte Kohlenstoff nicht in den üblichen Photosynthese-Folgeprodukten, sondern fast ausschließlich in Verbindungen des Citrat-Zyklus und in Aminosäuren.
Daß auch die Cytochrom f-Defekte dieser beiden, eine Gruppe mit vergleichbaren Defekten bildenden Mutanten nicht identisch sind, zeigen außerdem deutliche Unterschiede in Reaktionen des Elektronentransportes wie der Charakter der schnellen Chlorophyll-Fluoreszenz-Signale (Abb.6) oder auch die Charakteristika der von beiden Mutanten aufgenommenen Differenz-Spektren (Abb.3a).

Iσ: Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Mutante (HALLIER et al. 1978), fast normalgrün; ihre CO_2-Fixierung liegt bei knapp 1% der Leistung der Normalen. Weder die große noch die kleine Untereinheit des Fraktion I-Proteins, der RuBP-Carboxylase, noch ein Polypeptid in der Größenordnung der großen Untereinheit - die, wie bereits dargelegt, im Plastom kodiert ist - sind gelelektrophoretisch nachweisbar. Sehr ähnlich dieser Mutante Iσ ist die Mutante

Vα: ebenfalls eine RuBP-Carboxylase-Mutante (HALLIER et al. 1978). Diese Ähnlichkeit erstreckt sich auf Chlorophyllgehalt und CO_2-Fixierungsleistung wie auch auf das Nicht-Vorhandensein von Fraktion I-Protein oder eines Polypeptids dieser Größenordnung. Dennoch zeitigen auch hier die Messungen des Elektronentransportes charakteristische Unterschiede zu den Mutanten Iσ und IVβ, beispielsweise beim Vergleich der Dunkel-Licht-Absorptionsmessung, wo sich deutlich verschiedene Signalcharakteristika auf Belichtung hin ergeben (vgl. Abb.4 und bei HALLIER et al. 1978 fig.4), aber z.B. auch bei den Differenzspektren (Abb.3b), in denen sich der Elektronentransport widerspiegelt.

IVβ: RuBP-Carboxylase-Mutante (HALLIER et al. 1978), fast normalgrün; ihre CO_2-Fixierung liegt bei über 15% der normalen Leistung. Mit dieser relativ hohen Fixierungsrate nimmt die Mutante IVβ einen besonderen Platz im Oenotheren-Plastommutanten-Sortiment ein - bei fast allen anderen Mutanten liegt diese Rate bei unter 1% des Normalen. Daß auch diese Mutante nicht - trotz des vergleichbaren Defektes - mit den anderen Typen ihrer Gruppe (Iσ, Vα) gleichzusetzen ist, zeigt die Tatsache, daß sich bei ihr eine - wenn auch sehr geringe - Rest-Aktivität dieses die Fixierung von CO_2 katalysierenden Enzyms findet.

Noch deutlicher lassen sich die Unterschiede innerhalb dieser Dreiergruppe von RuBP-Carboxylase-Mutanten in immunochemischen Tests mit Hilfe monospezifischer Antiseren aufzeigen: während die Mutante Iσ im Enzymtest keine Aktivität der RuBP-Carboxylase erkennen läßt, kommt es im immunochemischen Test zur - wenn auch schwachen - Reaktion.

Bei der Mutanten Vα ist es umgekehrt, d.h. bei ihr ist eine Rest-Aktivität im Enzymtest nachzuweisen, doch kommt es im Immunotest zu keiner Reaktion.

Die Mutante IVβ wiederum zeigt eine schwache Rest-Aktivität der RuBP-Carboxylase im Enzymtest und im Immun-Test eine Reaktion in der Größe von etwa 10% derjenigen der Normalen.

Trotz der Ähnlichkeit des bei diesen drei Plastom-Mutanten festgestellten Defektes handelt es sich ganz offensichtlich doch auch hier - wie dies schon bei den beiden anderen Gruppen mit gleichen Defekten zu konstatieren war - um individuelle Unterschiede von Mutante zu Mutante, d.h. von Mutation zu Mutation.

Versucht man nun, wie eingangs bereits angedeutet, die aus der elektronenoptischen Bearbeitung der Plastom-Mutanten gewonnenen Befunde und ihre daraus durch KUTZELNIGG et al. (1975 a+b) erstellte tabellarische Einteilung mit den Ergebnissen der hier behandelten Untersuchungen und Defekt-Lokalisationen zu korrelieren, so zeigt sich sehr schnell, daß solche Parallelen zwischen den gewonnenen biochemischen Daten bzw. den festgestellten Defekt-Stellen und den Befunden der elektronenmikroskopischen Bearbeitung von Mutanten-Chloroplasten nicht nachzuweisen sind: auch Mutanten-Gruppen mit gleichen Defekten gehören in z.T. sehr unterschiedliche Gruppen von Plastidentypen der Kutzelnigg'schen Einteilung.

Es ist offensichtlich, daß nicht nur eng verwandte bzw. gleich erscheinende Mutations-Defekte einander nicht gleich sind, sondern auch, daß die Plastiden-Entwicklung jeweils eigene Wege geht und - zumindest bei unserem derzeitigen Kenntnisstand - keinen Rückschluß auf die Art des durch die Mutation verursachten Defektes innerhalb der biochemischen Abläufe der Photosynthese zuläßt.

Es ist seit längerem gesichert, daß physiologische Reaktionen über Genwirkketten vom genetischen Material des Kernes gesteuert werden, wobei als sekundäres Genprodukt ein spezifisches Enzym synthetisiert wird. Somit führen auch Genom-Veränderungen durch Mutationen direkt zu spezifischen Abänderungen bestimmter, individueller Proteine.

Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es, zu versuchen, in gleicher Weise wie bei Genom-Mutationen auch die durch Mutationen im Plastom bewirkten Veränderungen mit speziellen und möglichst konkret zu erfassenden Auswirkungen auf die Biochemie der Chloroplasten zu verknüpfen.

Die Ergebnisse dieser hier behandelten Untersuchungen an Plastom-Mutanten von Oenothera haben den Nachweis erbracht, daß wir in gleicher Weise wie beim Genom auch von Genwirkketten des Plastoms ausgehen müssen.

Die Befunde bestätigen, daß das Plastom unmittelbar nicht nur auf einzelne Glieder der Elektronentransportkette (HALLIER 1968, FORK und HEBER 1968, FORK et al. 1968, HALLIER und HEBER 1977) Einfluß nimmt (BÖRNER et al. 1976, CHUA 1976). Dies bedeutet: Einfluß auf die Synthese von Proteinen, welche als integrierte Bestandteile des Lamellarsystems Träger des Elektronentransportes sind, Strukturen, an welche die Energie-Übertragung in Gestalt transportierter Elektronen gebunden ist. Darüber hinaus bestätigen die Befunde, daß das Plastom auch Einfluß nimmt auf mit den Dunkelreaktionen der Photosynthese verknüpfte Proteine, d.h. auf Enzyme, welche den Ablauf des lichtabhängigen Kohlenhydrat-Anabolismus katalysieren (HALLIER et al 1978).

Bei den hier untersuchten Plastom-Mutanten hat die genetische Analyse ergeben, daß der durch die Mutation bewirkte genetische Defekt mit Sicherheit im Plastom zu suchen ist. Somit zeigen die bei einer Reihe von Mutanten lokalisierten Defekte hoher Spezifität, daß ein direkter Zusammenhang zwischen einem solchen genetischen Defekt des Plastoms und der Auswirkung an einer distinkten Stelle des Photosynthese-Apparates besteht.

Daraus ergibt sich, daß die Membransysteme von Plastiden ebenso wie Photosynthese-spezifische Proteine offenbar von Erbträgern kontrolliert werden, die innerhalb der betreffenden Organelle selbst lokalisiert sind.

Literaturverzeichnis

Amesz, J. u. D.C.Fork (1967): Quenching of chlorophyll fluorescence by quinones in algae and chloroplasts. Biochim.Biophys.Acta 143, 97-107

Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiol. 24, 1-15

Avron, M. u. B.Chance (1966): The relation of light-induced oxidation-reduction changes in cytochrome f of isolated chloroplasts to photophosphorylation. In: Currents in Photosynthesis (Eds. J.B.Thomas u. J.C.Goedheer), 455-463 Rotterdam

Avron, M. (1975): The electron transport chain in chloroplasts. In: Bioenergetics of Photosynthesis (Ed. Govindjee), 373-386 Academic Press New York

Baker, T.S., S.W.Suh u. D.Eisenberg (1977): Structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase: Form III crystals. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 74, 1037-1041

Barber, J., A.Telfer, J.Mills u. J.Nicholson (1974): Slow chlorophyll fluorescence changes in isolated intact chloroplasts: evidence for cation control. In: Proc.3rd Internatl.Congr.Photosynthesis, Rehovot (Ed. M.Avron), Vol.1, 53-63 Elsevier, Amsterdam

Bassham, J.A., K.Shibata, K.Steenberg, J.Bourdon u. M.Calvin (1956): The photosynthetic cycle and respiration: light-dark transients. J.Amer.Chem.Soc. 78, 4120-4124

Bassham, J.A. u. M.Kirk (1963): Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. Tokyo

Baur, E. (1909): Das Wesen und Erblichkeitsverhältnisse der "Varietates albo-marginatae hort." von Pelargonium zonale.
Z.indukt.Abst.- u.Vererbgslehre 1, 330-351

Bedbrook, J.R., G.Link, D.M.Coen, L.Bogorad u. A.Rich (1978): Maize plastid gene expressed during photoregulated development.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 75, 3060-3064

Behn, W. u. R.G.Herrmann (1977): Circular molecules in the β-satellite DNA of Chlamydomonas reinhardii.
Molec.gen.Genet. 157, 25-30

Blair, G.E. u. R.J.Ellis (1973): Protein synthesis in chloroplasts. I.Light-driven synthesis of the large subunit of fraction I protein by isolated pea chloroplasts.
Biochim.Biophys.Acta 319, 223-234

Boardman, N.K., S.W.Thorne u. J.M.Anderson (1966): Fluorescence properties of particles obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 56, 586-593

Börner, Th., B.Schumann u. R.Hagemann (1976): Biochemical studies on a plastid ribosome-deficient mutant of Hordeum vulgare. In: The Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Eds. Th.Bücher, W.Neupert, W.Sebald u. S. Werner), 41-48
North Holland, Amsterdam

Bohnert, H.-J., A.J.Driesel u. R.G.Herrmann (1976): Characterization of the RNA compounds, synthesized by isolated chloroplasts. In: The Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Eds. Th.Bücher, W.Neupert, W.Sebald u. S. Werner), 629-636
North Holland, Amsterdam

Butler, W.L. (1962): Effects of red and far-red light on the fluorescence yield of chlorophyll in vivo. Biochim.Biophys.Acta 64, 309-317

Butler, W.L. u. N.I.Bishop (1963): Action of two-pigment system on fluorescence yield of chlorophyll a. In: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. Natl.Acad.Sci.Natl.Res.Council publ. 1145, 91-100

Butler, W.L. (1966): Fluorescence yield in photosynthetic systems and ist relation to electron transport. In: Current Topics in Bioenergetics (Ed. D.R. Sanadi), Vol.I, 49-73
Academic Press, New York

Chan, P.H. u. S.G.Wildman (1972): Chloroplast DNA codes for the primary structure of the large subunit of fraction I protein.
Biochim.Biophys.Acta 277, 677-680

Chen, K., S.Johal u. S.G.Wildman (1976): Role of chloroplast and nuclear DNA genes during evolution of fraction I protein. In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Eds. Th. Bücher, W.Neupert, W.Sebald u. S.Werner), 3-11
North Holland, Amsterdam

Chua, N.H. (1976): A uniparental mutant of Chlamydomonas reinhardii with a variant thylakoid membrane polypeptide. In: The Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Eds. Th. Bücher, W.Neupert, W.Sebald u. S.Werner), 323-330
North Holland, Amsterdam

Coen, D.M., R.Bedbrook, L.Bogorad u. A.Rich (1977): Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulosebisphosphate carboxylase.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 74, 5487-5491

Correns, C. (1909a): Vererbungsversuche mit blaß(gelb)grünen und buntblättrigen Sippen bei Mirabilis jalapa, Urtica pilulifera und Lunaria annua. Z.indukt.Abst.- u.Vererbgslehre 1, 291-329

Correns, C. (1909b): Zur Kenntnis der Rolle von Kern und Plasma bei der Vererbung. Z.indukt.Abst.- u.Vererbgslehre 2, 331-340

Crouse, E.J., J.M.Schmitt, H.-J.Bohnert, K.Gordon, A.J.Driesel u. R.G.Herrmann (1978): Intramolecular compositional heterogeneity of Spinacia and Euglena chloroplast DNAs. In: Chloroplast Development (Eds. G.Akoyunoglou u. J.H.Argyroudi-Akoyunoglou), 565-572 North Holland, Amsterdam

de Kouchkovsky, Y. u. D.C.Fork (1964): A possible functioning in vivo of plastocyanin in photosynthesis as revealed by a light-induced absorbance change. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 52, 232-239

de Vries, H. (1909/10): The mutation theory. Chicago

Dobberstein, B., G.Blobel u. N.H.Chua (1977): In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of Chlamydomonas reinhardii. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 74, 1082-1085

Dolzmann, P. (1968): Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten. III.Strukturelle Aspekte. Z.Pflanzenphysiol. 58/4, 300-309

Driesel, A.J., E.J.Crouse, K.Gordon, H.-J.Bohnert, R.G.Herrmann, A.Steinmetz, M.Mubumbila, M.Keller, M.Burkard u. J.H.Weil (1979): Fractionation and identification of the individual spinach chloroplast transfer RNAs and mapping of their genes on the restriction endonuclease cleavage site map of chloroplast DNA. Gene 6, 285-306

Duysens, L.N.M. (1952): Transfer of excitation energy in photosynthesis.
Thesis Utrecht

Duysens, L.N.M. u. J.Amesz (1962): Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis.
Biochim.Biophys.Acta 64, 243-260

Duysens, L.N.M. u. H.Sweers (1963): Mechanisms of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria.
Plant Cell Physiol. Tokyo Spec.Issue, 353-372

Ellis, R.J. (1976): Fraction I protein. In: Comment.Plant Sci. (Ed. H.Smith), 31-43
Pergamon Press, Oxford

Ellis, R.J. (1977): Protein synthesis by isolated chloroplasts.
Biochim.Biophys.Acta 463, 185-215

Ellis, R.J., P.E.Highfield u. J.Silverthorne (1978): The synthesis of chloroplast proteins by subcellular systems. In: Photosynthesis 1977: Proc.4th Internatl.Congr.Photosynthesis (Eds. D.O. Hall, J.Coombs u. T.W.Goodwin), 497-506
The Biochemical Society, London

Fork, D.C. u. W.Urbach (1965): Evidence for the localization of plastocyanin in the electron transport chain of photosynthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 53, 1307-1315

Fork, D.C. u. Y.de Kouchkovsky (1966): The 518-mμ absorbance change and ist relation to the photosynthetic process.
Photochem.Photobiol. 5, 609-619

Fork, D.C., J.Amesz u. J.M.Anderson (1967): Light-induced reactions of chlorophyll b and P_{700} in intact plants and chloroplast fragments. In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus. Brookhaven Sympos.Biol.no.19, 81-94 Brookhaven Natl.Lab.Upton, New York

Fork, D.C. u. U.W.Heber (1968): Studies in electron-transport reactions of photosynthesis in plastome mutants of Oenothera. Plant Physiol. 43/4, 606-612

Fork, D.C., U.W.Heber u. M.-R.Michel-Wolwertz (1968): Studies on the photosynthesis of plastome mutants of Oenothera. Year Book 67 (1967/68) Carnegie Inst.Wash., Baltimore/Mld., 503-505

Gibbs, M., E.S.Bamberger, P.W.Ellyard u. R.G.Everson (1967): Assimilation of carbon dioxide by chloroplast preparations. In: Biochemistry of Chloroplasts (Ed. T.W.Goodwin), Vol.II, 3-38 London

Gibor, A. u. M.Izawa (1963): The DNA content of the chloroplasts of Acetabularia. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 50, 1164-1169

Gibor, A. u. S.Granick (1964): Plastids and mitochondria: Inheritable systems. Science 145, 890-897

Golbeck, J.H., S.Lien u. A.San Pietro (1977): Electron transport in chloroplasts. In: Encyclopedia of Plant Physiology N.S. Vol.V - Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation (Eds. A.Trebst u. M.Avron), 94-116 Springer, Berlin

Good, N., S.Izawa u. G.Hind (1966): Uncoupling and energy transfer inhibition in photophosphorylation. In: Current Topics in Bioenergetics (Ed. D.R.Sanadi), Vol.I, 75-112 New York

Govindjee u. G.Papageorgiou (1971): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: Fluorescence transients. In: Photophysiology. Current Topics in Photobiology and Photochemistry, Vol.VI, 1-46 Academic Press, New York

Granick, S. u. A.Gibor (1967): The DNA of chloroplasts, mitochondria and centrioles. Progr.Nucl.Acid.Res. 6, 143-186

Gray, P.W. u. R.B.Hallick (1978): Physical mapping of the Euglena gracilis chloroplast DNA and ribosomal RNA gene region. Biochem. 17, 284-289

Hagemann, R. (1964): Plasmatische Vererbung. In: Genetik. Grundlagen, Ergebnisse, Probleme in Einzeldarstellungen (Ed. H.Stubbe), Vol.4 Jena

Hagemann, R. (1968): Extrachromosomale Vererbung. Fortschr.Bot. 30, 225-241

Hagemann, R. (1971): Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. I.Die Bedeutung von Plastommutanten und die genetische Nomenklatur extranukleärer Mutationen. Biol.Zbl. 90, 409-418

Hallier, U.W., U.Heber u. W.Stubbe (1968): Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von Oenothera. I.Der reduktive Pentosephosphatzyklus. Z.Pflanzenphysiol. 58/3, 222-239

Hallier, U.W. (1968): Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von Oenothera. II.Die Bildung von ATP und NADPH. Z.Pflanzenphysiol. 58/4, 289-299

Hallier, U.W. u. U.W.Heber (1977): Cytochrome f deficient plastome mutants of Oenothera. Photosynthet.Organelles, Spec.Issue Plant & Cell Physiol., 257-273

Hallier, U.W., J.M.Schmitt, U.Heber, S.S.Chaianova u. A.D.Volodarsky (1978): Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-deficient plastome mutants of Oenothera.
Biochim.Biophys.Acta 504, 67-83

Heber, U. u. E.Tyszkiewicz (1962): The rate of photosynthesis in isolated chloroplasts.
J.Exp.Bot. 13/38, 185-200

Heber, U., N.G.Pon u. M.Heber (1963): Localization of carboxydismutase and triosephosphate dehydrogenases in chloroplasts.
Plant Physiol. 38, 355-360

Heber, U.W. u. K.A.Santarius (1964): Loss of adenosine triphosphate synthesis caused by freezing and its relationship to frost hardiness problems.
Plant Physiol. 39, 712-719

Heber, U.W. u. K.A.Santarius (1965): Compartmentation and reduction of pyridine nucleotides in relation to photosynthesis.
Biochim.Biophys.Acta 109, 390-408

Heber, U. u. C.S.French (1968): Effects of oxygen on the electron transport chain of photosynthesis.
Planta 79, 99-112

Heber, U. (1969): Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo.
Biochim.Biophys.Acta 180, 302-319

Herrmann, R.G., H.-J.Bohnert, K.V.Kowallik u. J.M.Schmitt (1975): Size, conformation and purity of chloroplast DNA of some higher plants.
Biochim.Biophys.Acta 378, 305-317

Herrmann, R.G., H.-J.Bohnert, A.Driesel u. G.Hobom (1976): The location of rRNA genes on the restriction endonuclease map of the Spinacia oleracea chloroplast DNA. In: The Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Eds. Th.Bücher, W.Neupert, W.Sebald u. S. Werner), 351-359
North Holland, Amsterdam

Hilgenheger, H. u. W.Menke (1965): Lichtabhängige, anisotrope Veränderungen des Chloroplastenvolumens in lebenden Zellen.
Z.Naturf. 20b, 699-701

Hill, R. u. F.Bendall (1960): Function of the two cytochrome components in chloroplast: a working hypothesis.
Nature 186, 136-137

Holm, G. (1954): Chlorophyll mutations in barley.
Acta Agricult.Scand. IV, 457-471

Jensen, R.G. u. J.T.Bahr (1977): Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase.
Ann.Rev.Plant Physiol. 28, 379-400

Junge, W. (1977a): Membrane potentials in photosynthesis.
Ann.Rev.Plant Physiol. 28, 503-536

Junge, W. (1977b): Physical aspects of light harvesting, electron transport and electrochemical potential generation in photosynthesis of green plants. In: Encyclop.Plant Physiol.N.S. Vol.V: Photosynthesis I (Eds. A.Trebst u. M.Avron), 59-93
Springer, Berlin, Heidelberg

Kandler, O. u. F.Schötz (1956): Untersuchungen über die photooxydative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorella-Mutanten und panaschierten Oenotheren.
Z.Naturf. 11b, 708-718

Kandler, O. u. I.Haberer-Liesenkötter (1963): Über den Zusammenhang zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese.
Z.Naturf. 18b, 718-730

Kautsky, H. u. A.Hirsch (1935): Der Einfluß des Sauerstoffs auf das Fluoreszenzverhalten lebender Blätter.
Biochem.Z. 278, 373-385

Khramkova, N.I., Z.A.Postnikova u. G.I.Abelev (1963): Antigenic structure of mouse hepatomas. III.A study of the organospecific liver antigens in the hepatomas with the aid of monospecific antibodies.
Neoplasma 10, 127-131

Kirk, J.T.O. u. R.A.E.Tilney-Bassett (1967): The Plastids. Their Chemistry, Structure and Inheritance.
London

Kirk, J.T.O. (1972): Genetic control of plastid formation. Recent advances and strategies for the future.
Sub-Cell.Biochem. 4, 333-361

Kok, B. u. G.M.Cheniae (1966): Kinetics and intermediates in the oxygen evolution step in photosynthesis. In: Current Topics in Bioenergetics (Ed. D.R.Sanadi) Vol.I, 1-47

Kolodner, R. u. K.K.Tewari (1975): The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants.
Biochim.Biophys.Acta 402, 372-390

Kowallik, K.V. u. R.G.Herrmann (1972): Variable amounts of DNA related to the size of chloroplasts.
IV.Three-dimensional arrangement of DNA in fully differentiated chloroplasts of Beta vulgaris L.
J.Cell Sci. 11, 357-377

Krause, G.H. (1973): The high-energy state of the thylakoid system as indicated by chlorophyll fluorescence and chloroplast shrinkage.
Biochim.Biophys.Acta 292, 715-728

Krause, G.H. (1974): Changes in chlorophyll fluorescence in relation to light-dependent cation transfer across thylakoid membranes.
Biochim.Biophys.Acta 333, 301-313

Kushida, H., M.Itoh, S.Izawa u. K.Shibata (1964): Deformation of chloroplasts on illumination in intact spinach leaves.
Biochim.Biophys.Acta 79, 201-203

Kutzelnigg, H. (1968): Versuche zur Auslösung von Plastommutationen bei Oenothera.
Diss.Düsseldorf

Kutzelnigg, H. u. W.Stubbe (1974): Investigations on plastome mutants in Oenothera. 1.General considerations.
Sub-Cell.Biochem. 3, 73-89

Kutzelnigg, H., B.Meyer u. F.Schötz (1975a): Untersuchungen an Plastom-Mutanten von Oenothera. II.Überblick über die Ultrastruktur der mutierten Plastiden.
Biol.Zbl. 94/5, 513-526

Kutzelnigg, H., B.Meyer u. F.Schötz (1975b): Untersuchungen an Plastom-Mutanten von Oenothera. III.Vergleichende ultrastrukturelle Charakterisierung der Mutanten.
Biol.Zbl. 94/5, 527-538

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

Lehmann, E. (1922): Die Theorien der Oenotheraforschung.
Jena

Levine, R.P. (1969): The analysis of photosynthesis using mutant strains of algae and higher plants.
Ann.Rev.Plant Physiol. 20, 523-540

Lilley, R.McC. u. D.A.Walker (1974): An improved spectrophotometric assay for ribulosebisphosphate carboxylase.
Biochim.Biophys.Acta 358, 226-229

Margolis, J. u. K.G.Kenrick (1968): Polyacrylamide gel electrophoresis in a continuous molecular sieve gradient.
Anal.Biochem. 25, 347-362

Mehler, A.H. (1951): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I.Mechanisms of the reduction of oxygen and other Hill reagents.
Arch.Biochem.Biophys. 33, 65-77

Mehler, A.H. u. A.H.Brown (1952): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III.Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes.
Arch.Biochem.Biophys. 38, 365-370

Mendiola-Morgenthaler, L.R., J.J.Morgenthaler u. C.A.Price (1976): Synthesis of coupling factor CF-1 protein by isolated spinach chloroplasts.
FEBS Lett. 62, 96-100

Meyer, A. (1883): Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung.
Leipzig

Michaelis, P. (1955): Über Gesetzmäßigkeiten der Plastom-Umkombination und über eine Methode zur Trennung einer Plastiden-, Chondriosomen- resp. Sphärosomen-, (Mikrosomen-) und einer Zytoplasmavererbung.
Cytologia Tokyo 20, 315-388

Mitchell, P. (1966): Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.
Biol.Rev. 41, 445-502

Nelson, N., H.Nelson u. G.Schatz (1980): Biosynthesis and assembly of the proton-translocating adenosine triphosphate complex from chloroplasts. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. in press

Nobel, P.S. (1968): Light-induced chloroplast shrinkage in vivo detectable after rapid isolation of chloroplasts from Pisum sativum. Plant Physiol. 43, 781-787

Olson, J.M. u. R.M.Smillie (1963): Light driven cytochrome reactions in Anacystis and Euglena. In: Photosynthetic Mechanisms of Green Plants. Natl.Acad.Sci.Natl.Res.Council Publ. 1145, 56-65

Packer, L. u. A.R.Crofts (1967): The energized movement of ions and water by chloroplasts. In: Current Topics in Bioenergetics (Ed. D.R.Sanadi) Vol. II, 24-64 New York

Papageorgiou, G. (1975): Chlorophyll fluorescence: an intransic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of Photosynthesis (Ed. Govindjee), 319-371 New York

Pedersen, T.A., M.Kirk u. J.A.Bassham (1966): Inhibition of photophosphorylation and photosynthetic carbon cycle reactions by fatty acids and esters. Biochim.Biophys.Acta 112, 189-203

Peterkofsky, A. u. E.Racker (1961): The reductive pentose phosphate cycle. III.Enzyme activities in cell-free extracts of photosynthetic organisms. Plant Physiol. 36, 409-414

Pon, N.G. (1960): Studies on the carboxydismutase system and related materials. Thesis Lawr.Rad.Lab.Berkeley/Cal.,Contr.no. W-7405-eng-48

Reisner, A.H., P.Nemes u. C.Bucholtz (1975): The use of Coomassie Brillant Blue perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal.Biochem. 64, 509-516

Renner, O. (1922): Eiplasma und Pollenschlauchplasma als Vererbungsträger bei den Oenotheren. Z.Vererbgslehre 27, 235-237

Renner, O. (1934): Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber.Verh.Sächs.Akad.Wiss.Leipzig, Math.-phys.Kl. 86, 241-266

Rochaix, J.D. u. P.Malnoe (1978): Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of Chlamydomonas reinhardii. Cell 15, 661-670

Rutner, A.C. u. M.D.Lane (1967): Nonidentical subunits of ribulose diphosphate carboxylase. Biochem.Biophys.Res.Commun. 28, 531-537

Sagher, D., H.Grosfeld u. M.Edelman (1976): Large subunit ribulose bisphosphate carboxylase messenger RNA from Euglena chloroplasts. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 73, 722-726

Santarius, K.A. u. U.Heber (1965): Changes in the intracellular levels of ATP, ADP, AMP and P_i and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis. Biochim.Biophys.Acta 102, 39-54

Scott, N.S. u. R.M.Smillie (1967): Evidence for the direction of chloroplast ribosomal RNA synthesis by chloroplast DNA. Biophys.Res.Comm. 28, 598-603

Schiff, J.A. u. H.T.Epstein (1966): The replicative aspect of chloroplast continuity in Euglena. In: Biochemistry of Chloroplasts (Ed. T.W.Goodwin), Vol.I, 341-353 New York

Schimper, A.F.W. (1883): Über die Entwickelung der Chlorophyllkörner und Farbkörper.
Bot.Zeit. 41, 105-112, 121-131, 137-146, 153-162

Schimper, A.F.W. (1885): Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde.
Jb.wiss.Bot. 16, 1-247

Schmidt, S., R.Reich u. H.T.Witt (1971): Electrochromism of chlorophylls and carotenoids in multilayers and in chloroplasts.
Naturwiss. 58, 414-415

Schmitt, J. (1978): Zur Funktion des genetischen Apparates der Plastiden: Nukleinsäuresynthese und plastomcodierte Proteine.
Diss.Düsseldorf

Schmitz, F. (1882): Die Chromatophoren der Algen.
Verh.Naturhist.Ver.preuß.Rheinlande 40, 1-176

Schneider, V. u. U.W.Hallier (1970): Polyvinylpyrrolidon als Schutzstoff bei der Untersuchung gerbstoffgehemmter Enzymreaktionen.
Planta 94, 134-139

Schötz, F. (1955): Untersuchungen an panaschierten Oenotheren. I.Über die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Chloroplasten in den blassen Arealen einiger Plastidenmutanten und Bastardschecken.
Z.Naturf. 10b, 100-108

Schötz, F., F.Senser u. H.Bathelt (1966): Untersuchungen über die Plastidenentwicklung und Pigmentausstattung der Oenotheren. II.Mutierte Biennis-Plastiden.
Planta 70, 125-154

Schötz, F. (1967): Extrachromosomale Vererbung.
Ber.dtsch.bot.Ges. 80, 523-538

Sewe, K.U. u. R.Reich (1977): The effect of molecular polarization on the electrochromism of carotenoids. II.Lutein-chlorophyll complexes: the origin of the field-indicating absorption-change at 520nm in the membranes of photosynthesis. Z.Naturf. 32c, 161-171

Stubbe, W. (1953): Genetische und zytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von Oenothera suaveolens. Z.indukt.Abst.- u.Vererbgslehre 85, 180-209

Stubbe, W. u. D.v.Wettstein (1955): Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von Oenotheren. Protoplasma XLV, 241-250

Stubbe, W. (1959): Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei Oenothera. Z.Vererbgslehre 90, 288-298

Stubbe, W. (1960): Untersuchungen zur genetischen Analyse des Plastoms von Oenothera. Z.Bot. 48, 191-218

Stubbe, W. (1963): Extrem disharmonische Genom-Plastom-Kombinationen und väterliche Plastidenvererbung bei Oenothera. Z.Vererbgslehre 94, 392-411

Stubbe, W. (1964): The role of the plastome in evolution of the genus Oenothera. Genetica 35, 28-33

Stubbe, W. (1966): Die Plastiden als Erbträger. In: Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Probleme der biologischen Reduplikation (Ed. P.Sitte). 3.wiss.Konf.Ges.Dt.Naturf.u.Ärzte, Semmering b.Wien 1965, 273-288 Berlin

Stubbe, W. (1971): Origin and continuity of plastids. In: Results and Problems in Cell Differentiation, Vol.2: Origin and Continuity of Cell Organelles (Eds. J.Reinert u. H.Ursprung), 65-81 Berlin

Tedeschi, H. u. D.L.Harris (1958): Some observations on the photometric estimation of mitochondrial volume. Biochim.Biophys.Acta 28, 392-402

Trebst, A. (1974): Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. Ann.Rev.Plant Physiol. 25, 423-458

Trebst, A. (1978): Organization of the photosynthetic electron transport system of chloroplasts in the thylakoid membranes. In: 29.Mosbach-Coll.: Energy Conservation in Biological Membranes (Eds. G.Schäfer u. M.Klingenberg), 84-95 Berlin

Urbach, W., M.A.Hudson, W.Ullrich, K.A.Santarius u. U.Heber (1965): Verteilung und Wanderung von Phosphoglycerat zwischen den Chloroplasten und dem Cytoplasma während der Photosynthese. Z.Naturf. 20b/9, 890-898

Volodarsky, A.D., S.S.Chaianova, U.Heber, U.W.Hallier u. J. Schmitt (1979): Determination of the content of enzyme proteins by an immunochemical test-system. Fiziologia Rastenii 26, 71-74

Wadsworth, C. u. L.A.Hanson (1960): Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique. Int.Arch.Allergy 17, 165-177

Walker, D.A. (1965): Correlation between photosynthetic activity and membrane activity in isolated pea chloroplasts. Plant Physiol. 40, 1157-1161

Witt, H.T. u. R.Moraw (1959): Untersuchungen über die Primärvorgänge bei der Photosynthese.
Z.Physik.Chemie (N.F.) 20, 283-298

Witt, H.T., B.Suerra u. J.Vater (1966a): Conditions for the isolation of reaction cycle II. Rate of water splitting, location of the rate-determining step of the over-all reaction: the electron carrier Y. In: Currents in Photosynthesis. Proc.second Western-Europe Conf.Photosynthesis, Woudschoten, Zeist, Holland, Sept.1965 (Eds. J.B.Thomas u. J.C.Goedheer), 273-283 Donker, Rotterdam

Witt, H.T., G.Döring, B.Rumberg, P.Schmidt-Mende, U.Siggel u. H. H.Stiehl (1966b): Electron transport in photosynthesis. In: Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus (Eds. J.M.Olson, G. Hind, H.Lyman u. H.W.Siegelman).
Brookhaven Symp.Biol. 19, 161-168
New York

Witt, H.T. (1971): Coupling of quanta, electrons, fields, ions and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis.
Quart.Rev.Biophys. 4, 365-377

Witt, H.T. (1976): Primary actions of excited molecules in the functional membrane of photosynthesis. In: Excited States of Biological Membranes.
Proc.Intern.Conf.Lisboa 1974, 245-261
New York

Wollgiehn, R. u. K.Mothes (1963): Über DNS in den Chloroplasten von Nicotiana rustica.
Naturwiss. 50, 95-96

Wollgiehn, R. u. K.Mothes (1964): Über die Incorporation von ^{3}H-Thymidin in die Chloroplasten-DNS von Nicotiana rustica. Exptl.Cell Res. 35, 52-57

Yamashita, T. u. W.L.Butler (1969): Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to photosystem II.
Plant Physiol. 44, 435-438